

Estabilização de Flavonóides Lábeis por Imobilização em Matrizes Sólidas

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Núria Vanessa Gouveia Fernandes

MESTRADO EM BIOQUÍMICA APLICADA



UNIVERSIDADE da MADEIRA

A Nossa Universidade

www.uma.pt

Maio | 2017

Estabilização de Flavonóides Lábeis por Imobilização em Matrizes Sólidas

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Núria Vanessa Gouveia Fernandes

MESTRADO EM BIOQUÍMICA APLICADA

ORIENTADORA

Paula Cristina Machado Ferreira Castilho



ESTABILIZAÇÃO DE FLAVONÓIDES LÁBEIS POR IMOBILIZAÇÃO EM MATRIZES SÓLIDAS

Esta dissertação foi desenvolvida na linha de Produtos Naturais do Centro de Química da Madeira (CQM), sob a orientação da Professora Doutora Paula Cristina Machado Ferreira Castilho. Foi apresentada à Universidade da Madeira, para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica Aplicada.

Núria Vanessa Gouveia Fernandes

2017

Funchal, Madeira - Portugal

*“Há uma força motriz mais poderosa que o vapor, a electricidade e a energia atómica: a **vontade!**”*

Albert Einstein

Agradecimentos

À Universidade da Madeira e a todos os professores, por todo o profissionalismo ao longo da minha formação académica. O conhecimento transmitido, a exigência imposta, as imensas horas de estudo, as muitas dores de cabeça, deram frutos!

Ao Centro de Química da Madeira, por ter permitido que eu desenvolvesse o meu projecto nas suas instalações, mais precisamente no NatLab (Laboratório de Química Orgânica e Produtos Naturais).

Ao Professor Doutor João Rodrigues, pelo excelente trabalho que desenvolve enquanto coordenador científico do Centro de Química da Madeira, movendo montanhas em prol do centro e dos seus investigadores. Um especial obrigado pelos conselhos, pela preocupação, pelas palavras de reconhecimento, incentivo, amizade e força, quando o cansaço induziu à vontade (errada) de desistir!

À Professora Doutora Paula Cristina Machado Ferreira Castilho, por ter aceitado ser minha orientadora neste projecto. O meu mais sentido obrigado pela partilha de conhecimento, pela sabedoria, pela persistência e pela entrega. Por todas as vezes que me lembrou que o que não nos mata, nos torna mais fortes e que é na adversidade que nos tornamos mais sábios. Obrigada pela acessibilidade e pela oportunidade que me deu de sair da minha zona de conforto e ir à procura de respostas, em sítios novos através de técnicas novas. Relembro as suas palavras quando referiu que eu saia vencedora em tudo o que me metia. Esta é uma vitória nossa!

Ao CBIOS (Centro de Investigação em Ciências e Tecnologias da Saúde da Universidade Lusófona de Humidades e Tecnologias), em particular à **Professora Doutora Catarina Rosado**, agradeço por me ter recebido e pelo tempo dispendido a ensinar uma técnica desconhecida para mim. Um muito obrigado pois sem a sua disponibilidade não teria sido possível realizar uma parte fundamental deste trabalho.

Ao Hospital Dr. Nélcio Mendonça e à Lanxess pelas amostras de talco farmacêutico e resina sintética Lewatit, gentilmente cedidas.

Ao Pedro Ideia! Este é o meu agradecimento pessoal, público, e mais do que merecido! Muitas foram as vezes que te agradeci mas nunca foram demais e aqui fica o meu muito obrigado novamente. Por teres acreditado em mim, por me teres ajudado, por me teres incentivado quando eu própria duvidei. Por todo o companheirismo, amizade, exigência, por todas as horas de raciocínio (uns mais lógicos do que outros, e pelas gargalhadas nos menos lógicos), por todas as horas à volta do caderno do conhecimento, por tudo ao longo deste percurso! Porque sem ti tinha sido mais difícil chegar onde cheguei, e tu sabes! Admiro-te muito enquanto pessoa, investigador e perfeccionista assumido que és, pois entregas tanto quanto és em tudo o que fazes, seja em que área for. O teu entusiasmo pela vida torna-te único e genial. Que nunca mudes! Aplausos para ti!

Ao Gonçalo Martins, colega, companheiro e amigo nesta jornada do Mestrado. Por todos os cafés entre aulas, por todas as horas de estudo, por todos os trabalhos que ficaram mais ou menos bonzinhos, por todos os dias que estavam quase a acabar, por todos os livros da 20^a página do Google, por todos os pedidos de opinião que ignoraste e fizeste como querias, por todas as Gonçalves e viagensinhas. Pelo bom humor, pela simplicidade, por toda a partilha, por toda a amizade sincera e pelo companheirismo. Por seres das melhores pessoas que conheço e por ter tido o privilégio de partilhar esta jornada contigo. Espero levar-te para vida! Porque nunca foi interesse, nem órgãos!

Ao Vitor Agostinho Spínola, por todos os momentos partilhados contigo, os bons e os menos bons. Pelo teu espírito de sacrifício em prol dos outros, por todos os momentos que abdicaste do teu trabalho para ouvires os meus desabafos e as minhas frustrações quando algo corria menos bem e quando estava revoltada com o mundo. Obrigada pelos lanches e pelas gordices de festejo, porque o açúcar sempre foi um bom conselheiro. Por toda a preocupação e amizade implícitas no teu jeitinho Suricata que te é tão característico (e muitas vezes enervante). Mas eu sei que era para o meu bem. Por todas as conversas que tivemos sobre as injustiças do mundo, sem os teus conselhos *let it go* não teria sido a mesma coisa. És um grande Senhor, e pretendo levar-te comigo, sempre! “Vamos?Vamos!”.

Aos restantes colegas do NatLab e do CQM que partilharam os longos dias de trabalho, as dúvidas, as frustrações e os desabafos. Pelos bons momentos passados e pelo espírito de inter-ajuda. Um sentido obrigada.

À Paula Andrade e à Paula Sousa, técnicas de laboratório, pela disponibilidade e simpatia.

À Sofia Sousa e à Mara Dionísio, por toda a ajuda com esta coisa das TIC e dos *softwares* que não obedecem à inteligência Humana. Como diz o provérbio popular “*cada macaco no seu galho*”. Obrigada por me quebrarem o galho. *You rock!*

À Nanci Camacho e à Sara Pestana, por todas as vezes que me ajudaram, sem sequer imaginarem o quão estavam a ajudar. Em simples palavras no momento certo, ou até nas mensagens mais sentidas que me fizeram chorar! Porque chorar lava a alma e as amizades verdadeiras também! Obrigada por todas as palavras de incentivo, por toda a preocupação e por todas as asneiradas nos entretantos. Gosto muito de vocês!

Aos meus pais, Agostinho Fernandes e Iolanda Fernandes, por todo o investimento, dedicação, companheirismo, entrega e amor ao longo da minha formação académica e cívica. Tudo o que sou e tudo o que consegui até hoje devo a vocês e aos valores que me transmitiram. Se cheguei até aqui foi graças à garra, força e resistência que desde cedo me inculcaram. Não há palavras que descrevam o quão privilegiada me sinto por poder partilhar a minha vida com pessoas fantásticas como vocês! Obrigada por não terem criado uma princesinha!

Ao Anselmo Nóbrega, amigo, companheiro, namorado e marido. Por estar sempre lá, nos bons e nos maus momentos, nos dias felizes e nos dias difíceis. Por nunca me teres virado as costas nos dias em que eu estava menos bem (quase insuportável)! Pela amizade, paciência, carinho, amor e tolerância quando nem eu tinha capacidade de me tolerar. Foram 2 anos muito duros para nós, mas muito importantes e cheio de realizações pessoais. Por todos os desabafos que ouviste, e por todos os que acabaram por sobrar para ti. Por todos os conselhos que me deste e me fizeram aceitar melhor o que não podia mudar. É uma honra partilhar a minha vida com uma pessoa com um coração gigante como o teu! Que seja sempre assim, na saúde e na doença, todos os dias das nossas vidas. *Para sempre no meu coração, ninguém vai levar você de mim!*

A todos os que de alguma forma contribuíram para o meu sucesso nesta etapa, o meu muito obrigado!

Resumo

As antocianinas são uma classe de pigmentos naturais cuja utilização é interessante enquanto alternativa aos corantes artificiais. Estas moléculas degradam-se facilmente sendo necessário estabilizá-las para que possam ser incluídas em produtos comerciais. A adsorção em matrizes sólidas porosas é uma possível forma de estabilização.

A variação da cor é um indicador importante na avaliação da qualidade nas indústrias alimentar e cosmética e é monitorizada por espectrofotometria UV-Vis em líquidos ou por métodos colorimétricos de reflectância em sólidos.

Este trabalho avalia a imobilização de antocianinas extraídas a partir de fontes naturais em cinco matrizes sólidas. Extractos ricos em antocianinas foram obtidos a partir de bagas de *Myrica faya*, *Rubus grandifolia* e *Vaccinium cylindraceum* e foram imobilizados em 5 adsorventes: 3 argilas, talco farmacêutico e resina sintética não-funcionalizada Lewatit. A eficácia de adsorção foi medida por quantificação espectrofotométrica UV-Vis da antocianina em solução antes e após contacto com o adsorvente. A estabilidade dos complexos antocianina/adsorvente expostos a condições de radiação e temperatura elevada foi avaliada por métodos colorimétricos (CIELab).

Os extractos de *Myrica faya* e *Rubus grandifolia* apresentaram apenas glucosídeos de cianidina enquanto os extractos de *Vaccinium cylindraceum* continham 10 conjugados glicosídicos de delfinidina, cianidina, petunidina, malvidina e ponidina. Os parâmetros de adsorção foram optimizados: concentração de solução de extracto de antocianina 5g/L, tempo de adsorção 20 minutos, pH 4,3, temperatura ambiente. Os complexos foram submetidos a processos de degradação acelerada e a estabilidade foi avaliada pelas variações colorimétricas traduzidas por parâmetros CIELAB. Os resultados são apresentados em valores de L*, a* e b* e em *swatches* de cor obtidos pelo software Adobe Photoshop.

A quantidade de antocianina adsorvida no equilíbrio de adsorção variou entre 2 a 43 mg de antocianina por grama de adsorvente; a resina Lewatit foi o melhor adsorvente e o talco o pior. As 3 argilas mostraram resultados idênticos de cerca de 20 mg/g.

A resina que adsorve mais quantidade corresponde ao complex menos estável. As argilas provaram ser os adsorventes mais adequados.

Palavras-chave: Antocianinas; Estabilidade; Adsorção; Argilas; CIELab; Bagas vermelhas.

Abstract

Anthocyanins are a class of natural pigments that are interesting alternatives to artificial colorants. They degrade easily, so they need to be stabilized to be include in commercial products. Adsorption into porous solids is a possible form of stabilization. Color variation is an important indicator of quality assessment in food and cosmetics industries and it is monitorized by UV/Vis spectroscopy in liquids or by reflectance colorimetric methods in solids.

This work, evaluates the immobilization of anthocyanins into five solid matrices.

Anthocyanin rich extracts were obtained from *Myrica faya*, *Rubus grandifolia* and *Vaccinium cylindraceum* berries and were immobilized on 5 sorbents: 3 clays, 1 talc and 1 synthetic resin (non-functionalized Lewatit). Adsorption efficiency was measured by UV-Vis quantification of anthocyanin in solution before and after contact with adsorbent. The stability of anthocyanin / adsorbent complexes exposed to radiation conditions and temperature was evaluated by colorimetric methods (CIELab).

Myrica faya e *Rubus grandifolia* showed only cyanidin glucosides while *Vaccinium cylindraceum* presented 10 glucoside conjugates of delphinidin, cyanidin, petunidin, malvidin and peonidin. Adsorption parameters were optimized: initial anthocyanin extract solution concentration 5g/L, time of contact 20 minutes, pH 4,3, at room temperature. Complexes were submitted to processes of accelerated degradation and stability was evaluated by color variations, as CIELAB parameters. Results are presented as L*, a* and b* and as color swatches using Adobe Photoshop software.

Adsorption at equilibrium ranged from 2 to 43 mg of anthocyanin/g of adsorbent, the best the resin and the worst the talk. The 3 clays showed similar results, about 20 mg/g. The resin, which adsorbs the highest quantity, forms the least stable complex. Clays proved to be the most adequate adsorbents.

Keywords: Anthocyanins; Stability; Adsorption; Clays; CIELab; Red berries.

Lista de Publicações

Lista de comunicações orais

Fernandes N., Castilho P. C.; Immobilization of natural anthocyanins into solid matrices and evaluation of their color stability; 4th CQM Annual Meeting; Funchal, Madeira; 03rd & 4th February, 2017.

Ideia P., **Fernandes N.**, Pinto J., Castilho P. C.; Immobilization of natural anthocyanins into solid matrices and evaluation of their color stability; 5th International Phytocosmetics and Phytotherapy Congress; Patras, Greece; 15th -17th May, 2017.

Índice Geral

Agradecimentos	v
Resumo.....	ix
Abstract	xi
Lista de Publicações	xiii
Índice Geral	xv
Índice de Figuras	xix
Índice de Tabelas.....	xxv
Lista de Abreviaturas	xxvii
Nota introdutória	1
Enquadramento temático	3
Objectivo.....	4
I. Revisão bibliográfica.....	5
1. ANTOCIANINAS	7
1.1. Introdução	7
1.2. Classificação fitoquímica	8
1.3. Definição.....	11
1.4. Estrutura química	12
1.5. Comportamento químico	15
1.5.1. Efeito do pH.....	16
1.6. Estabilidade	20
1.6.1. Factores que influenciam a estabilidade	20
1.6.2. Estratégias para aumentar a estabilidade	24
1.7. Fontes de antocianinas	26
1.7.1. Bagas	28
1.8. Benefícios para a saúde humana	29
1.8.1. Capacidade antioxidante	30

2.	ADSORÇÃO.....	35
2.1.	Adsorção enquanto técnica de estabilização	35
2.2.	Definição de adsorção.....	35
2.3.	Fundamentos da adsorção.....	36
2.3.1.	Etapas da adsorção	39
2.3.1.1.	Transporte externo do soluto	39
2.3.1.2.	Transporte interno	39
2.3.1.3.	Equilíbrio	40
2.3.2.	Tipos de interacções moleculares.....	40
2.4.	Adsorventes	41
2.5.	Processos de adsorção aplicados na indústria	43
3.	ADSORVENTES NÃO-CONVENCIONAIS.....	44
3.1.	Introdução.....	44
3.2.	Adsorventes não-convencionais.....	45
3.3.	Argilas.....	45
3.3.1.	Definição.....	46
3.3.2.	Estrutura.....	47
3.3.3.	Classificação	52
3.3.3.1.	Esmectites (Montmorilonites e Saponites)	52
3.3.3.2.	Bentonite	55
3.3.3.3.	Talco.....	56
3.3.4.	Propriedades electrocinéticas das argilas.....	58
3.3.5.	Aplicações das argilas.....	63
3.4.	Resinas	64
3.4.1.	Composição química e estrutura	65
3.4.2.	Propriedades físico-químicas e de operação.....	66
3.4.3.	Lewatit VP OC 1064 MD PH.....	67

3.5. Aplicação industrial dos adsorventes não-convencionais	68
II. Parte Experimental, resultados, discussão e conclusões	69
1. Extracção de antocianinas e optimização dos parâmetros de adsorção.....	71
1.1. Objectivo	71
1.2. Metodologia.....	71
1.2.1. Antocianinas.....	71
1.2.2. Adsorventes	73
1.2.3. Parâmetros de trabalho.....	74
1.3. Resultados e discussão.....	78
1.3.1. Antocianinas.....	78
1.3.2. Parâmetros de trabalho.....	82
1.4. Conclusões.....	102
2. Avaliação da estabilidade de antocianinas imobilizadas em matrizes sólidas – determinação da actividade antioxidante (DPPH).....	104
2.1. Objectivo	104
2.2. Metodologia.....	104
2.2.1. Preparação das matrizes sólidas carregadas com antocianinas	104
2.2.2. Determinação da actividade antioxidante das matrizes preparadas	106
2.2.3. Estudo de estabilização das antocianinas imobilizadas em matrizes sólidas – monitorização de actividade antioxidante ao longo do tempo	107
2.3. Resultados e discussão.....	108
2.4. Conclusões.....	114
3. Avaliação da estabilidade das antocianinas imobilizadas em matrizes sólidas – Análise colorimétrica (CIELAB)	115
3.1. Objectivo	115
3.2. Exposição das matrizes sólidas a condições extremas de temperatura e exposição solar	115
3.3. Análise de cor das matrizes sólidas	116

3.4.	Resultados e discussão.....	116
3.4.1.	Análise colorimétrica - Adsorventes fornecidos (AF) vs. Adsorventes carregados (AC).....	123
3.4.2.	Avaliação da estabilidade de antocianinas adsorvidas e submetidas a condições de degradação – análise colorimétrica.....	127
3.4.2.1.	Adsorventes carregados (AC) vs. Adsorventes carregados e expostos à radiação/irradiados (ACI)	127
3.4.2.2.	Adsorventes carregados (AC) vs. Adsorventes carregados e expostos à radiação/irradiados (ACI)	132
3.5.	Conclusões.....	136
III.	Conclusões.....	139
IV.	Referências.....	143
V.	Anexos.....	151

Índice de Figuras

Fig. 1 - Compostos fenólicos das bagas. Adaptado de: [14]	8
Fig. 2 - Estrutura química geral dos principais flavonóides. Adaptado de: [18].....	10
Fig. 3 - Estrutura básica das antocianidinas (aglicona) [9].....	12
Fig. 4 - Estrutura química do catião <i>flavilium</i> . Grupo substituinte do C-3, R= glicosídeo ou glicosídeo acilado [11].....	13
Fig. 5 - Estrutura química da cianidina-3-glucosídeo. Adaptado de: [21].....	15
Fig. 6 - Formas químicas das antocianinas de acordo com o pH, onde: $R_1 = H$ ou glicosídeo; R_2 e $R_3 = H$ ou CH_3 . Adaptado de [9].....	18
Fig. 7 – Quatro formas estruturais das antocianinas coexistentes na gama de pH de 4 a 6. Adaptado de [9].....	19
Fig. 8 – Estrutura do cromóforo das antocianinas, catião <i>flavilium</i> , quando estabilizado em meio aquoso. Onde R normalmente é um açúcar ou um açúcar acilado. Adaptado de: [11].....	19
Fig. 9 – Estruturas das principais antocianinas encontradas nas bagas. Adaptado de [18].	28
Fig. 10 - Representação da reacção química de neutralização do DPPH. Adaptado de [27].....	33
Fig. 11 - Equação de redução do $DPPH\cdot$ a $DPPH_2$, segundo o mecanismo de transferência do átomo de hidrogénio [27].....	33
Fig. 12 – Estrutura química do Trolox. Adaptado de [29].	34
Fig. 13 – Ilustração representativa das principais etapas do processo de adsorção: 1A – Transporte externo do soluto da solução-meio para a “fronteira”; 1B – Transporte do soluto da “fronteira” para a entrada do poro do adsorvente; 2- Transporte interno da entrada do poro do adsorvente para os sítios-activos do mesmo; 3- Adsorção do soluto aos sítios-activos da superfície interna do adsorvente. Adaptado de: [31].....	37

Fig. 14 – Processo de adsorção industrial, em tanque com agitação. Adaptado de [31]	43
Fig. 15 - Representação esquemática da estrutura <i>sandwiche</i> de uma argila T-O-T. A) <i>sandwiche</i> do ponto de vista estrutural; B) estrutura do ponto de vista químico (vermelho a estrutura tetraédrica; azul a estrutura octaédrica). Adaptado de [36].	47
Fig. 16- Representação da estrutura laminar característica das argilas. Adaptado de [36].	48
Fig. 17 - Esquematização simultânea dos três tipos de classificação das argilas. Adaptado de [36].	50
Fig. 18 – Representação esquemática de uma argila montmorilonite [36].	51
Fig. 19 – Representação estrutural de argilas e respectivas morfologias (obtidas por microscopia electrónica de varrimento): A- representação estrutural de uma esmectite; B- representação estrutural do talco; C- morfologia de uma esmectite; D- morfologia do talco. Adaptado de [36].	51
Fig. 20 - Representação esquemática de: A- unidade tetraédrica individual; B- lâmina de unidades tetraédricas. Adaptade de [37].	52
Fig. 21 – Representação esquemática de: A- unidade octaédrica individual; B- lâmina de unidades octaédricas. Adaptado de [37].	53
Fig. 22 - Representação esquemática da estrutura de uma argila esmectite. Adaptado de [37].	53
Fig. 23- Representação esquemática da estrutura do talco [36].	56
Fig. 24 – Morfologia das partículas talco (obtida por microscopia electrónica de varrimento) [36].	57
Fig. 25 - Representação dos ângulos de contacto entre um líquido e um sólido; A- material hidrofóbico; B- material hidrofílico; C- material semi-hidrofílico. Adaptado de: [36].	60

Fig. 26 – Esquema ilustrativo da hidrofiliçidade das argilas: (a) ângulos de contacto resultantes da interacção do líquido com a superfície do sólido; (b) gráfico representativo dos ângulos de contacto comuns de alguns sólidos. Adaptado de [36]. .	62
Fig. 27 – Representação esquemática do processo de expansão/hidratação de uma argila (montmorilonite); A- argila desidratada/seca; B- argila hidratada (camada única de moléculas de água); C- argila hidratada (dupla camada de moléculas de água). Adaptado de: [37]	62
Fig. 28 – Esquematização das metodologias de extracção e purificação aplicadas.	73
Fig. 29 – Esquematização dos ensaios de optimização da concentração da solução de extrato.	76
Fig. 30 – Esquematização genérica da metodologia aplicada nos ensaios de adsorção.	77
Fig. 31 - Esquematização da metodologia aplicada nos estudos de cinética de adsorção.	78
Fig. 32 - Cromatogramas optidos por HPLC-DAD para o extracto de faia: A- fracção acetato de etilo (<i>liofilizado 4</i>); B- extracto purificação (<i>liofilizado 3</i>); 1- antocianinas; 2 e 3 – outros compostos.....	80
Fig. 33 - Espectro de varrimento de UV-Vis (350-700 nm) de uma solução de extracto de faia a diferentes pH's.	83
Fig. 34 – Quantidade de antocianina adsorvida, em função da concentração de solução inicial de extrato de faia.	86
Fig. 35 - Quantidade de antocianina adsorvida, em todos os adsorventes, a partir de soluções iniciais de extrato (5 g/L).	87
Fig. 36 - Modelos de preenchimento espacial da cianidina-3-glucosídeo [21].	91
Fig. 37 - Curva de cinética de adsorção de extracto de antocianina de faia, amora e uveira dos Açores (5 g/L) na argila NaSDN ₃	96
Fig. 38 - Curva de cinética de adsorção de extracto de antocianina de amora (5 g/L) na resina lewattit.	97

Fig. 39 - Curva de cinética de adsorção de extracto de antocianina de amora (5 g/L) no talco.	98
Fig. 40 - Curva de cinética de adsorção de extracto de antocianina de uveira dos Açores (5 g/L) no talco.	100
Fig. 41 - Metodologia aplicada para preparação das matrizes sólidas.	104
Fig. 42 - Esquematização dos lotes de matrizes obtidos para o estudo.	105
Fig. 43 - Metodologia aplicada para determinação da actividade antioxidante das antocianinas imobilizadas nas matrizes sólidas em estudo.	106
Fig. 44 - Recta de calibração Trolox-DPPH.	107
Fig. 45 - Esquematização da metodologia aplicada no estudo da estabilização das antocianinas imobilizadas nas matrizes sólidas em estudo.	108
Fig. 46 - Variação da actividade antioxidante das matrizes adsorvidas com antocianinas da faia, ao longo das 4 semanas de exposição solar.	113
Fig. 47 - Esquematização da metodologia aplicada na determinação da cor das matrizes em estudo (CIELAB).	115
Fig. 48 - Colorímetro utilizado nos ensaios colorimétricos: colorímetro CR-300 da Konica Minolta.	118
Fig. 49 - Representação do espaço de cor CIELAB e respectivos eixos. Adaptado de: [60]	118
Fig. 50 - Exemplificação do processo de criação de <i>swatches</i> de cor por conversão das coordenadas CIELAB em adobe photosop CC 2015.	121
Fig. 51- <i>Swatches</i> de cor obtidos para todas as amostras, durante o estudo colorimétrico.	122
Fig. 52 - <i>Swatches</i> de cor resultantes da análise CIELAB. Comparação entre resultados obtidos para os adsorventes originais e os adsorventes imediatamente após adsorção de antocianinas.	125

Fig. 53 – Comparação da cor real dos AF e <i>swatch</i> de cor obtido por CIELAB. A- fotografia; B- CIELAB.	126
Fig. 54 - Comparação de cor entre Lewatits: A- fornecida; B- carregada com faia; C- carregada com amora; D- carregada com uveira Açores.	127
Fig. 55 - <i>Swatches</i> de cor resultantes da análise CIELAB. Comparação entre resultados obtidos para os adsorventes carregados (iniciais) e os adsorventes carregados expostos à radiação solar durante 8 semanas.	128
Fig. 56 - Comparação de cor entre o ACI Talco: A- faia; B- amora; C- uveira.....	131
Fig. 57 - Comparação de cor da Lewatit: A- AC lewatit/faia; B- ACI lewatit/faia; C- AC lewatit/amora; D- ACI lewatit/amora; E- AC lewatit/uveira; F- ACI lewatit/uveira. ..	131
Fig. 58 - <i>Swatches</i> de cor resultantes da análise CIELAB. Comparação entre resultados obtidos para os AC e para os ACT.....	133
Fig. 59 - Comparação entre a cor da Lewatit: A1 – AC Lewatit/; B1- ACT Lewatit/faia; A2 – AC Lewatit/amora; B2 – ACT Lewatit/amora; A3 – AC Lewatit/uveira; B3 – ACT Lewatit/uveira.....	135
Fig. 60 - Comparação de cor entre Lewatit: A1 – ACI Lewatit/faia; B1 – ACT Lewatit/faia; A2 – ACI Lewatit/amora; B2 – ACT Lewatit/amora; A3 – ACI Lewatit/uveira; B3 – ACT Lewatit/uveira.....	135

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Padrões de substituição individual das posições 3' e 5' das seis antocianinas mais comuns nas plantas vasculares. Adaptado de: [9,11,13].....	14
Tabela 2 – Plantas comestíveis fontes de antocianinas e respectivo conteúdo de antocianinas (mg/g). Adaptado de [13].....	27
Tabela 3 - Aplicações industriais das argilas. Informação disponível em [36].....	64
Tabela 4 - Propriedades físicas, químicas e de operação da resina Lewatit VP OC 1064 MD PH. Adaptado de [44].....	67
Tabela 5 - Informações de recolha das amostras.....	72
Tabela 6 - Perfil de antocianinas presente em cada fonte natural.	78
Tabela 7 – Quantidade de extracto purificado.....	81
Tabela 8 - Quantificação de antocianina adsorvida (mg) por grama de adsorvente (peso seco).	85
Tabela 9 - Quantidade de antocianina adsorvida (mg (anto))/g (adsorvente seco)): comparação da quantidade adsorvida aos 2 minutos de adsorção e no equilíbrio.	95
Tabela 10 - Capacidade máxima de adsorção de cada adsorvente. Comparação entre valores obtidos ao fim de 2 horas e de 5 horas de adsorção.	99
Tabela 11 – Capacidade de adsorção dos diferentes adsorventes, no equilíbrio, e tempo necessário para que atinjam o equilíbrio.....	101
Tabela 12 - Quantidade de antocianina adsorvida (miligrama de antocianina por grama de adsorvente) nos adsorventes carregados.	105
Tabela 13 – Actividade antioxidante das matrizes adsorvidas com antocianinas de faia, após exposição solar por 4 semanas. Resultados expressos em milimolar de equivalentes de trolox por grama de adsorvente.	111
Tabela 14 – Parâmetros de a^* e ΔE^* obtidos para a argila SWy-2.....	129
Tabela 15 - Parâmetros colorimétricos obtidos para o adsorvente Talco.	133

Lista de Abreviaturas

UV-Vis	Espectrofotometria ultra-violeta visível
UV	Ultra-violeta
OH	Hidroxilo
H	Hidrogénio
OCH ₃	Metoxilo
C3	Carbono 3
Rs	Rosinidina
Eu	Europinidina
Au	Aurantidinina
Lt	Luteolinidina
Pn	Peonidina
Pg	Pelargonidina
Cy	Cianidina
Mv	Malvidina
Pt	Petunidina
Df	Delfinidina
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
DPPH	2,2-difenil-1-piril-hidrazil
Trolox	Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
CEC	Capacidade de troca iónica
XRD	Difracção de raios-X
EFDA	European Food and Drug Administration
DVB	Divinilbenzeno
NaOH	Hidróxido de sódio
HCl	Ácido clorídrico
BET	Área de superfície
LC-MS	Cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de díodo acoplado
AF	Adsorventes fornecidos
AC	Adsorventes carregados
ACI	Adsorventes carregados expostos a radiação/irradiados
ACT	Adsorventes carregados sujeitos a temperaturas elevadas

Nota introdutória

O presente projecto foi desenvolvido no Laboratório de Produtos Naturais e Química Orgânica (NatLab) do Centro de Química da Madeira (CQM).

Este projecto surge no seguimento da crescente necessidade do desenvolvimento de estratégias que visem aumentar a estabilidade de corantes naturais com vista à substituição dos corantes sintéticos nas indústrias alimentar e cosmética.

Neste projecto foi estudado a possibilidade de aumentar a estabilidade de antocianinas, extraídas a partir de fontes naturais, por imobilização/adsorção em matrizes sólidas orgânicas (resina sintética Lewatit) e inorgânicas (argilas e talco).

Para um melhor entendimento, a dissertação está organizada em capítulos.

O Capítulo I consiste numa contextualização sobre a temática em estudo por meio de uma revisão bibliográfica que está organizado em três subcapítulos. O sub-capítulo das antocianinas versa sobre a classificação, a estrutura e o comportamento químico destas moléculas e explica os benefícios para a saúde humana e as fontes naturais onde podem ser encontradas. No segundo sub-capítulo consta o tema da adsorção enquanto técnica de estabilização; é explicado os fundamentos do processo de adsorção e as características dos materiais/adsorventes utilizados neste tipo de processos. O capítulo é finalizado com o sub-capítulo dos adsorventes não-convencionais onde é introduzido o conceito dos adsorventes não-convencionais e respectivas características, propriedades e aplicações industriais (das argilas e das resinas).

O Capítulo II - *Parte experimental, resultados, discussão e conclusões* - compila a informação de cada uma das partes experimentais que constituem a dissertação. Este capítulo está organizado em sub-capítulos: o primeiro diz respeito à extracção de antocianinas e optimização dos parâmetros de adsorção, o segundo e o terceiro referem-se à avaliação da estabilidade das antocianinas imobilizadas, por determinação da actividade antioxidante (DPPH) e por análise colorimetria (CIELab), respectivamente.

O Capítulo III é dedicado às conclusões do presente projecto.

O “capítulo” IV diz respeito às referências utilizadas.

A dissertação é concluída com alguns anexos.

Enquadramento temático

As antocianinas representam uma categoria de flavonóides, que pertencem à classe dos compostos fenólicos que por sua vez dizem respeito a uma parte dos compostos produzidos pelo metabolismo secundário das plantas [1].

Estes flavonóides são pigmentos solúveis em água e muito importantes na coloração exibida pelas plantas já que são responsáveis por conferir cores brilhantes – que variam desde o vermelho ao azul, rosa e até púrpura - tanto às plantas como aos frutos [1,2].

Para além da cor, as antocianinas apresentam benefícios para a saúde pois apresentam diversas actividades biológicas: anticancerígenas, anti-inflamatórias, hepatoprotectoras, entre outras. Contudo são mais conhecidas pelas suas potentes propriedades antioxidantes [1,3,4].

As antocianinas não apresentam toxicidade, particularidade que as torna interessantes enquanto corantes naturais, daí o crescente interesse da indústria em substituir os corantes sintéticos por estes corantes naturais, não só por questões de segurança e preferência dos consumidores, mas também por obrigações legislativas. Neste sentido, as antocianinas são um dos aditivos naturais mais utilizados em produtos alimentares e cosméticos, nos quais o contacto directo com o corpo humano é inevitável [1–4].

Os corantes naturais são altamente instáveis, o que limita a sua utilização já que a cor é uma das propriedades mais importantes na avaliação da qualidade dos alimentos, e um atributo fundamental para fins de *marketing*. Um bom exemplo do quão instáveis são os corantes naturais são as antocianinas cuja instabilidade se reflecte directamente na cor que exibem: estas moléculas perdem facilmente a cor, principalmente quando são submetidas a condições neutras ou ligeiramente básicas e quando são expostas à radiação e a temperaturas elevadas [1,3].

Para que seja possível utilizar as antocianinas como aditivos alimentares, a estabilidade destes compostos é crucial. Daí que cada vez mais estejam a ser desenvolvidos estudos no sentido de aumentar a estabilidade destas moléculas, estando já descritas algumas hipóteses para ultrapassar esta limitação [1,2].

Um dos métodos promissores no aumento da estabilidade de moléculas orgânicas é a incorporação em materiais hospedeiros inorgânicos. Está comprovado o aumento da

estabilidade de corantes por imobilização em argilas, zeólitos e em silicatos mesoporosos [2,3].

Os materiais constituídos por pigmentos biológicos imobilizados em sólidos são denominados de biohíbridos e constituem materiais ecológicos atractivos, principalmente quando os sólidos são de origem geológica. Por este motivo, a preparação dos biohíbridos e possíveis aplicações dos mesmos tem sido temática de grande interesse em diversos estudos [2].

O exemplo mais conhecido de um biohíbrido é o corante *Maya Blue* cuja estabilidade anormal despertou interesse nos cientistas para averiguar, não só a sua estrutura, como a origem da elevada estabilidade que este corante apresenta. Concluíram que se trata de um biohíbrido no qual o pigmento indigo de origem biológica é altamente estabilizado por incorporação no interior das lâminas de uma argila natural microporosa (*palygorskite*) [2,3].

Neste sentido, foram iniciados vários estudos cujo intuito é o aumento da estabilidade das antocianinas através da sua imobilização em argilas. Vários trabalhos reportam a estabilização destes pigmentos naturais por intercalação no espaço interlaminar de argilas montmorilonites e no interior dos poros de silicatos mesoporosos de alumínio. Está também reportada a hibridização de antocianinas biológicas com argilas do tipo esmectite, bem como foi comprovada a estabilização de pigmentos catiónicos neste tipo de argilas [2,3].

Objectivo

É neste contexto que surge o presente projecto. O principal objectivo é a estabilização de antocianinas, extraídas a partir de fontes naturais, por imobilização/adsorção em matrizes sólidas porosas. Simultaneamente, o objectivo passa por aprofundar o conhecimento acerca do comportamento das matrizes sólidas porosas face ao processo de imobilização/adsorção de antocianinas.

I. Revisão bibliográfica

1. ANTOCIANINAS

1.1. Introdução

A tendência mundial da utilização de corantes naturais para substituição dos corantes sintéticos resultou num crescente interesse nas antocianinas, por parte da indústria alimentar [5].

As antocianinas têm vindo a ganhar cada vez mais importância enquanto corantes alimentares seguros e eficazes, com a designação E163, sendo que no ano de 1980 a produção mundial anual foi estimada em cerca de 10.000 toneladas, exclusivamente a partir de uvas [5,6].

O potencial que estas moléculas apresentam na substituição dos corantes sintéticos prende-se com as suas próprias características, visto apresentarem cores atractivas e brilhantes, bem como serem solúveis em água, para além de terem propriedades biológicas benéficas [7,8]. O facto de não apresentarem toxicidade é igualmente crucial para que as antocianinas sejam cada vez mais utilizadas como corantes naturais e até como um indicador de qualidade na produção alimentar [7,8].

Graças ao grande potencial que apresentam, as antocianinas têm sido referenciadas em diversas áreas de estudo, tanto no desenvolvimento de técnicas analíticas para a sua purificação e separação, como na verificação de alterações de cor [9].

As antocianinas são moléculas de grande interesse para os biólogos, químicos e enologistas, visto que contribuem para as cores brilhantes e atractivas que a maior parte dos alimentos, vegetais e outros produtos apresentam [7,10].

Apesar de existirem inúmeras estruturas individuais de antocianinas identificadas na Natureza, aproximadamente 700 de acordo com a literatura, o perfil de antocianinas para cada planta é diferente [7,10].

Estas moléculas podem ser encontradas em diversos vegetais – batata, espinafres, paprica, milho roxo, rabanete vermelho, couve roxa e couve verde – e numa grande variedade de frutas – cerejas, amoras, morangos, tomate inglês, líchias, romãs, entre outros [10].

1.2. Classificação fitoquímica

A coloração que as plantas apresentam é conferida por várias classes de corantes naturais, tais como as clorofilas, os carotenóides, as betalainas, os taninos e os flavonoides (dos quais são exemplo as antocianinas) [11,12].

As antocianinas pertencem à classe fitoquímica dos flavonóides, na qual estão incluídos a maioria dos pigmentos hidrossolúveis das plantas terrestres. Esta classe de compostos é comum à maioria das plantas, sendo predominantemente encontrada nos chás, mel, vinhos, frutos, vegetais, nozes, azeite, cacau e cereais [11,13].

São igualmente classificadas como polifenóis ou compostos fenólicos/polifenólicos e destacam-se de todos os compostos da mesma classe por serem os únicos com capacidade de absorver a luz ultra-violeta e a luz da gama visível (do amarelo/alaranjado ao azul/esverdeado) [11,13].

O fenómeno da variação de cor é particularmente visível nas flores, mas as antocianinas também são encontradas na maior parte das plantas terrestres mundiais e contribuem para a coloração das folhas, caules, raízes e frutos - desde os vários tons de vermelho/carmim ao azul/roxeado, incluindo laranja/amarelo e até incolor [11,13].

➤ Polifenóis

Os polifenóis/compostos polifenólicos são uma classe de fitoquímicos nos quais se incluem os flavonóides, dos quais fazem parte as antocianinas (Fig.1) [11].

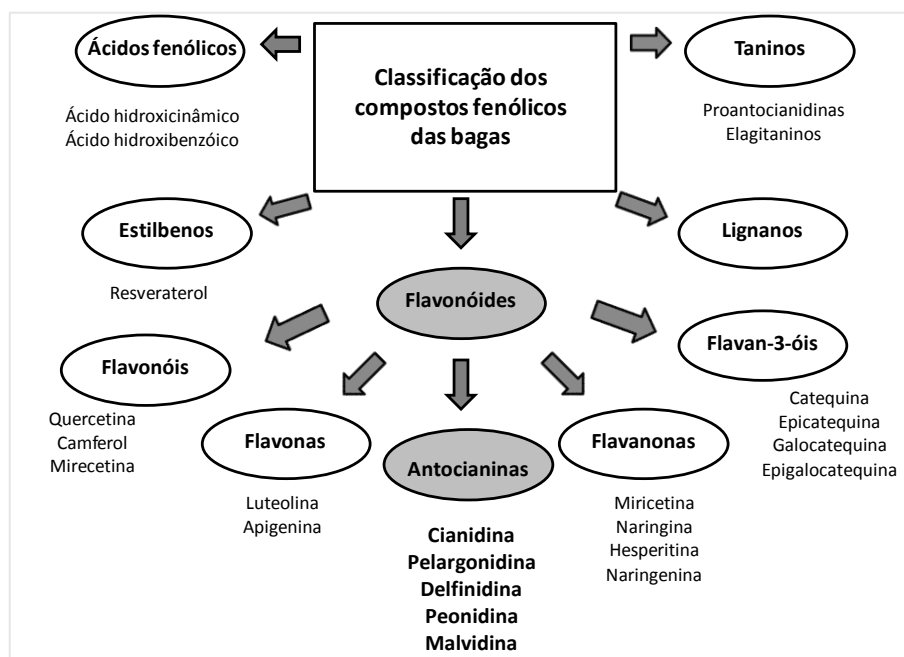


Fig. 1 - Compostos fenólicos das bagas. Adaptado de: [14]

Entende-se por polifenóis a classe de metabolitos secundários produzidos pelas plantas vasculares, que compreendem vários milhares de moléculas (simples e complexas), e que derivam da via metabólica do ácido xiquímico e poliacetato. Todas estas substâncias naturais têm em comum a presença de um ou mais anéis benzénicos, que por sua vez apresentam um ou mais grupos hidroxilo [15].

As diferenças verificadas entre as diferentes classes de polifenóis existentes baseiam-se nas variações em torno da estrutura química base: grau de oxidação, hidroxilações, metilações, glicosilações e possíveis ligações a outras moléculas, nomeadamente metabolitos primários (hidratos de carbono, lípidos, entre outros) ou metabolitos secundários fenólicos [15].

Apesar de serem dos compostos mais importantes produzidos pelas plantas, são instáveis e pouco solúveis. A baixa biodisponibilidade que apresentam também é um factor limitante na aplicação dos mesmos em áreas como a cosmética, nutrição e saúde [15].

➤ **Flavonóides**

Os flavonóides, amplamente distribuídos no reino das plantas, são compostos fenólicos naturais que podem ser ingeridos a partir de vegetais, frutos e bebidas. São produzidos pela via metabólica do ácido xiquímico, constituem o principal grupo de fenólicos solúveis e são o grupo de compostos fenólicos mais importante nos alimentos [13,16,17].

Representam uma grande família de metabolitos secundários, com quase 6000 estruturas identificadas em plantas, e agrega um vasto grupo de compostos de baixo peso molecular [17].

As principais classes de compostos desta família, representadas na Fig.2, são:

- Antocianinas (ex: cianidina, pelargonidina, petunidina...)
- Flavonóis (quercetina e canferol)
- Flavonas (luteolina e apigenina)
- Flavanonas (miricetina, naringina, hesperitina, naringenina)
- Flavan-3-óis (catequina, epicatequina, galocatequina)

Apesar de muitas vezes serem classificadas separadamente, as isoflavonas também compreendem uma das principais classes de flavonóides [13].

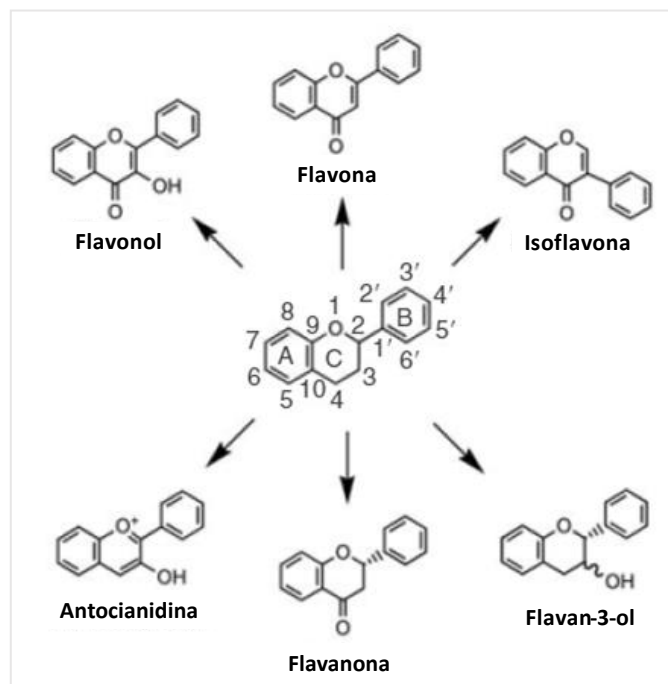


Fig. 2 - Estrutura química geral dos principais flavonóides. Adaptado de: [18]

A principal função destes compostos nas plantas é a de conferir protecção ultra-violeta (UV) e actuam como protectores dos tecidos em casos específicos de *stress* oxidativo ou ataques de patogénicos. Simultaneamente, dão coloração às flores e ajudam a atrair espécies polinizadoras que contribuem para a reprodução e proliferação da espécie [17].

Os flavonóides apresentam diversas actividades fisiológicas e biológicas diferentes, resultado do grande número de estruturas químicas possíveis que constituem esta família de compostos. A actividade de cada flavonóide está directamente relacionada com o grau de glicosilação e com o tipo de resíduo de açúcar (e subsequente acilesterificação); são exemplo as seguintes actividades biológicas: antialérgica, antibacteriana, anti-inflamatória, antimutagénica, antioxidante, antiproliferativa, antitrombótica, anti-viral e por apresentarem efeitos hepatoprotectores [13,16,17].

Precisamente por serem compostos multifacetados para a saúde humana, os fitoquímicos desta classe são frequentemente referidos como biofitoquímicos [13,17].

É sugerido que os flavonóides sejam absorvidos no intestino humano sob a mesma forma com que surgem naturalmente na Natureza, isto é, sob a forma de glicosídeos [16]. É estimado que a ingestão diária destas moléculas, a partir de fontes naturais,

ronde os 500 mg a 1g, valor que pode ser aumentado para várias gramas por dia caso sejam consumidos suplementos de flavonoides (extractos de sementes de uva, ginkgo biloba, entre outros); nos países ocidentais, o consumo diário foi estimado em 23mg/dia, que pode ser aumentado para 2 a 3 gramas/dia por reforço com o consumo de ervas e especiarias [13,16].

No caso específico das antocianinas, são ingeridas a partir da alimentação como parte de misturas complexas de flavonóides, sendo que o consumo diário está estimado em 200 mg/dia [19].

Os flavonóides apresentam uma grande capacidade antioxidante, consequência da especificidade das suas estruturas químicas que lhes permite neutralizar o stress oxidativo através de variados mecanismos. Tanto a actividade antioxidante dos flavonóides como a sua capacidade de neutralização de radicais se encontra bem estudada; a eficiência destes compostos em neutralizar aniões superóxido (tanto de origem enzimática como não-enzimática) está bem documentada [16,17].

1.3. Definição

Do grego “*anthos*” (flor) e “*kianos*” (azul), as antocianinas fazem parte da grande família dos flavonóides, destacando-se por terem a grande capacidade de absorver a luz visível. São os pigmentos mais importantes das plantas e são as responsáveis pelas colorações brilhantes (rosa, vermelho, púrpura e azul) que as flores, os frutos, as folhas e alguns vegetais apresentam, dependendo do pH do meio [6,9,13,20]

Todavia, o fenómeno da grande variação de cor induzido pelas antocianinas é mais visível nas flores [11,13].

Estes pigmentos são encontrados nos vacúolos dos tecidos das plantas superiores e caracterizam-se por serem inócuas, inodoras e altamente solúveis em água, tornando-as interessantes para utilização como corantes naturais. São igualmente insípidas, por isso apenas contribuem para o sabor sob a forma de adstringência moderada [9,13,20].

O facto de as antocianinas induzirem tantas e variadas cores às plantas é curioso se for tido em conta que apenas existe um único cromóforo - o núcleo *flavilium*. Isto deve-se às subtis interacções deste composto com os biocompostos existentes nos vacúolos das plantas, incluindo a água [11].

Segundo vários estudos, actualmente, já existem cerca de 500-700 antocianinas isoladas a partir de plantas e devidamente identificadas. É esta grande variedade

encontrada na Natureza que torna estes compostos tão interessantes e complexos [7,10,13].

1.4. Estrutura química

No que diz respeito à estrutura química, as antocianinas são derivados das suas estruturas básicas, as antocianidinas (agliconas), que são moléculas planares, constituídas por um anel aromático (anel A) ligado a um anel heterocíclico que contém oxigénio (anel C), que por sua vez estabelece uma ligação carbono-carbono a um terceiro anel aromático (anel B) (Fig.3) [7,9,18].

A maioria das antocianinas tem em comum a estrutura básica dos flavonóides (C15) - mais especificamente C6-C3-C6 [11,12].

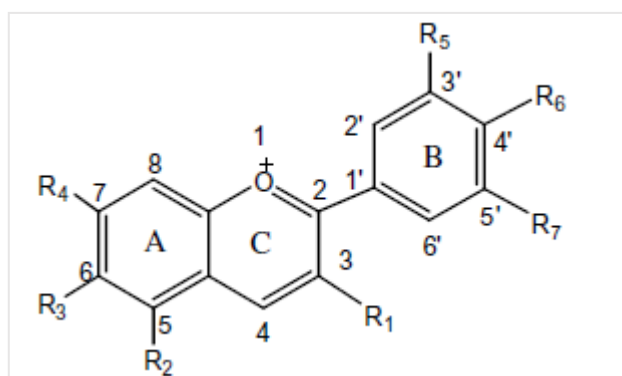


Fig. 3 - Estrutura básica das antocianidinas (aglicona) [9].

As antocianinas, são, na sua maioria, derivados 3-glucosídeos das antocianidinas; isto é, consistem numa antocianidina ligada a, pelo menos, um açúcar no carbono 3 [13]. Quando isto acontece, à espécie resultante dá-se o nome de catião *flavilium* (2-fenilbenzopirilium) - representado na Fig.4 - que na sua forma iónica apresenta duas ligações duplas no anel C. Isto resulta numa carga positiva intrínseca, que se encontra deslocalizada ao longo de toda a estrutura, apesar dos carbonos 2 e 4 serem os átomos com mais carga [7,11–13].

As duplas ligações conjugadas são as responsáveis pela absorção da luz em comprimentos de onda específicos – na gama dos 500 nm – o que se reflecte nas cores típicas destes pigmentos [1].

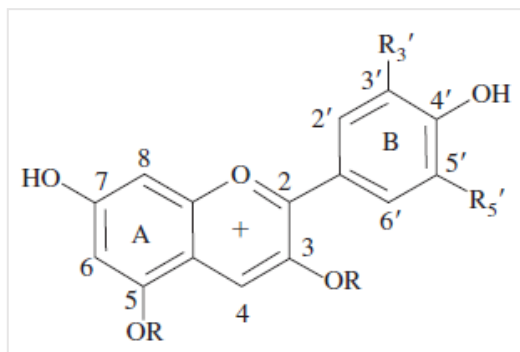


Fig. 4 - Estrutura química do catião *flavilium*. Grupo substituinte do C-3, R= glicosídeo ou glicosídeo acilado [11].

As antocianinas propriamente ditas surgem quando as antocianidinas se encontram glicosiladas, isto é, quando estabelecem ligação a, pelo menos, um glicosídeo/açúcar [9].

Amplamente dispersas pelo reino vegetal, as antocianinas diferenciam-se entre si de acordo com as substituições que a estrutura básica sofre [7,18].

Nos anéis A, B e C do esqueleto *flavilium* (Fig.4) - mais precisamente nos carbonos C-3/5/7/3'/4'/5' - encontram-se os grupos substituintes; tal como o próprio nome indica, podem ser substituídos por grupos hidroxilo (OH), grupos metoxil (OCH₃) ou açúcares (glicosídeos) [7,10,12,13].

Quanto aos grupos hidroxilo e metoxilo (OH e OCH₃), o número e a posição onde se encontram influenciam directamente no comportamento químico das antocianinas [10].

No que diz respeito aos açúcares, encontram-se reportados como substituintes a glicose (Glu), a arabinose (Ara), a ramanose (Rha), a galactose (Gal), a xylose (Xyl) e ainda o ácido glucorónico (GlcA). Adicionalmente, podem ser acilados por ácidos - num total de 12 ácidos diferentes - e é possível a coexistência de três acilações diferentes. Para além disto, também é possível que apresentem os seus grupos OH esterificados por ácidos aromáticos ou alifáticos [10,11].

Mas, além dos açúcares e das possíveis acilações e esterificações que os mesmos podem sofrer, as antocianinas também formam conjugados com hidroxicinamatos e com ácidos orgânicos (tais como ácido málico e ácido acético). Esta conjugação ocorre maioritariamente ao nível do carbono 3 (C3), podendo igualmente ocorrer nos carbonos 5, 7, 3' e 5' [18].

As várias conjugações possíveis de todos os factores acima referidos resultam num grande número de antocianinas presentes na Natureza, tornando o perfil de antocianinas único em cada planta [7].

Resumindo, a grande diferença entre o grande número de antocianinas existentes na Natureza depende de:

- número de grupos hidroxilados;
- natureza e número de açúcares ligados à estrutura básica;
- os carboxilatos alifáticos ou aromáticos ligados ao açúcar da molécula e a posição na qual ocorrem estas ligações [9].

Até ao momento, estão reportadas cerca de 500 antocianinas diferentes, e 23 antocianidinas distintas, entre as quais são de realçar a existência de dez mais comuns, nomeadamente: a rosinidina (Rs), a europinidina (Eu), a aurantinidina (Au), a luteolinidina (Lt), a peonidina (Pn), a pelargonidina (Pg), a cianidina (Cy), a malvidina (Mv), a petunidina (Pt) e, por fim, a delphinidina (Dp). São estas últimas seis que originam as antocianinas mais comuns nos tecidos das plantas, por monoglicosilação da sua posição R₃. [9,10,12,18]

Estas seis estruturas mais comuns resultam do padrão de substituição individual nas posições 3' e 5', para além das hidroxilações das posições 4' e 7 do esqueleto C-15 básico – o *flavilium*. Os referidos padrões e respectivas antocianinas encontram-se representados na tabela 1 [11].

Tabela 1 - Padrões de substituição individual das posições 3' e 5' das seis antocianinas mais comuns nas plantas vasculares. Adaptado de: [9,11,13]

Nome comum da antocianidina	Abreviatura	Substituintes 3' e 5'	Distribuição nos frutos e vegetais	Cor principal	Designação E
Pelargonidina	Pg	H/H	12%	Laranja/salmão	E163d
Cianidina	Cyn	OH/H	50%	Magenta	E163a
Peonidina	Pn	OCH ₃ /H	12%	Magenta	E163e
Delphinidina	Dp	OH/OH	12%	Púrpura/azul	E163b
Petunidina	Pt	OH/OCH ₃	7%	Púrpura	E163f
Malvidina	Mv	OCH ₃ /OCH ₃	7%	Púrpura	E163c

Note-se que os grupos OH e OCH₃ responsáveis pela denominação característica das seis antocianinas mais comuns, geralmente, substituem o anel B do esqueleto da aglicona destes pigmentos [11].

No reino das plantas, 90% das antocianinas resultam da modificação das seis antocianidinas principais. No entanto são os derivados glicosídicos das três antocianidinas não-metiladas (Cy, Dp e Pg) os mais comuns na natureza, encontrados em 80% das folhas pigmentadas, 69% em frutos e 50% em flores. Os restantes 20% das antocianinas reportadas correspondem às três antocianidinas metiladas – peonidina, petunidina e malvidina [7,9].

Apesar da estabilidade química e da solubilidade das antocianidinas aumentarem proporcionalmente com o nível de glicosilação, são os derivados 3-glucosídeo os mais frequentes (comparativamente aos 3,5-diglicosídeos) e de entre os quais se destaca a cianidina-3-glucosídeo, representada na Fig.5 [7,9].

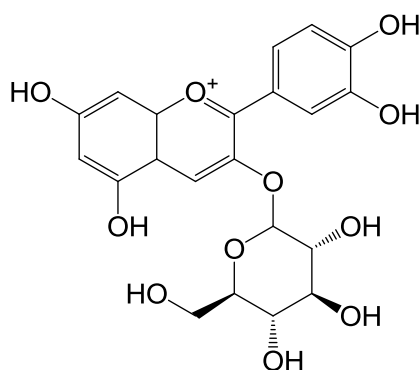


Fig. 5 - Estrutura química da cianidina-3-glucosídeo. Adaptado de: [21].

1.5. Comportamento químico

Estudos com base em cálculos teóricos foram realizados a fim de prever, não só o comportamento químico das antocianinas em diversas soluções, bem como determinar a interacção de alguns ácidos orgânicos com estas moléculas e de que forma afectam a sua coloração (efeito de co-pigmentação) [9].

Foi concluído que as antocianinas formam complexos com um número considerável de polifenóis naturais através da transferência de carga do polifenol para a antocianina na sua forma catiónica [9].

Conclusões acerca das características estruturais e electrónicas de quatro antocianidinas (Pg, Cy, Dp e Au) foram igualmente reunidas: após a determinação das

suas estruturas planares e não-planares, concluiu-se que a primeira é ligeiramente mais estável do que a segunda [9].

Do ponto de vista químico, as antocianinas são tanto mais estáveis e solúveis em água/álcool, quanto maior o grau de glicosilação que apresentam [7,9].

Também os grupos substituintes OH e OCH₃ influenciam o comportamento químico das antocianinas. Aquelas com maior número de grupos OCH₃ apresentam maior coloração vermelha, resultado da crescente metilação dos grupos OH. Já aquelas que apresentam coloração azul/púrpura deve-se a apresentarem um maior número de grupos hidroxil (OH) livre [7,10].

Em soluções ácidas as antocianinas assumem carga positiva, resultado da presença de grupos OH nos anéis da estrutura básica destas moléculas [10].

Outro factor que influencia o comportamento químico das antocianinas é a presença/ausência de um grupo OH *orto* (*o*-OH). Assim sendo, a Cy, a Dp e a Pt, por possuírem um *o*-OH, são mais sensíveis à oxidação, contrariamente à Mv e à Pn que apresentam mais resistência à oxidação [7].

Quando isoladas, as antocianinas não são estáveis, tornando-se mais suscetíveis à degradação. Assim, as antocianinas poliméricas – resultado da condensação de antocianinas com acetaldeídos, taninos e outros compostos fenólicos – são mais estáveis do que as antocianinas monoméricas livres [9,22,23].

1.5.1. Efeito do pH

De entre todas as moléculas que constituem a família dos flavonóides, as antocianinas destacam-se por variar a cor desde o vermelho ao azul/púrpura. Isto resulta da sua capacidade única de formar várias formas do catião *flavilium*, de acordo com o pH [10,12].

A propriedade única das antocianinas sofrer alterações estruturais de acordo com o pH do meio torna-as ótimos indicadores naturais de pH. Isto porque todas estas conversões podem ser monitorizadas pois são acompanhadas por mudanças de cor acentuadas; as antocianinas apresentam-se vermelhas em pH ácido e azuis em pH básico. Em condições de pH neutro a antocianina pelargonidina é a mais estável, comparativamente com as restantes seis antocianinas mais comuns [9,13,24].

As estruturas químicas das antocianinas variam entre as coloridas e as incolores, sendo o equilíbrio altamente dependente do pH do meio, conforme representado na Fig.6 [5,9].

Assim sendo, temos que:

- $1 < \text{pH} < 2,4 \rightarrow$ o catião polar *flavilium* é a espécie predominante, contribui para a coloração púrpura e vermelho, e pode sofrer várias transformações estruturais com o aumento do pH. É a estrutura mais estável de todas as estruturas possíveis nas antocianinas (Fig.6A) [5,9];
- $2 < \text{pH} < 4 \rightarrow$ em soluções aquosas ligeiramente ácidas ou neutras, o catião *flavilium* é solvatado e convertido em bases quinoidais, espécies predominantes nesta gama de pH que se podem apresentar na forma neutra (púrpura) e/ou ionizada (azul) (Fig.6B) [5,8,9];
- $5 < \text{pH} < 6 \rightarrow$ presença de duas espécies incolores, a pseudobase carbinol e chalcona (Fig.6E e Fig.6F, respectivamente) [9];
- $7 < \text{pH} \rightarrow$ degradação das antocianinas, dependendo dos seus grupos substituintes, sendo que grupos hidroxilo (OH) e metoxilo (OCH₃) adicionais diminuem a estabilidade da aglicona em meio básico [9].

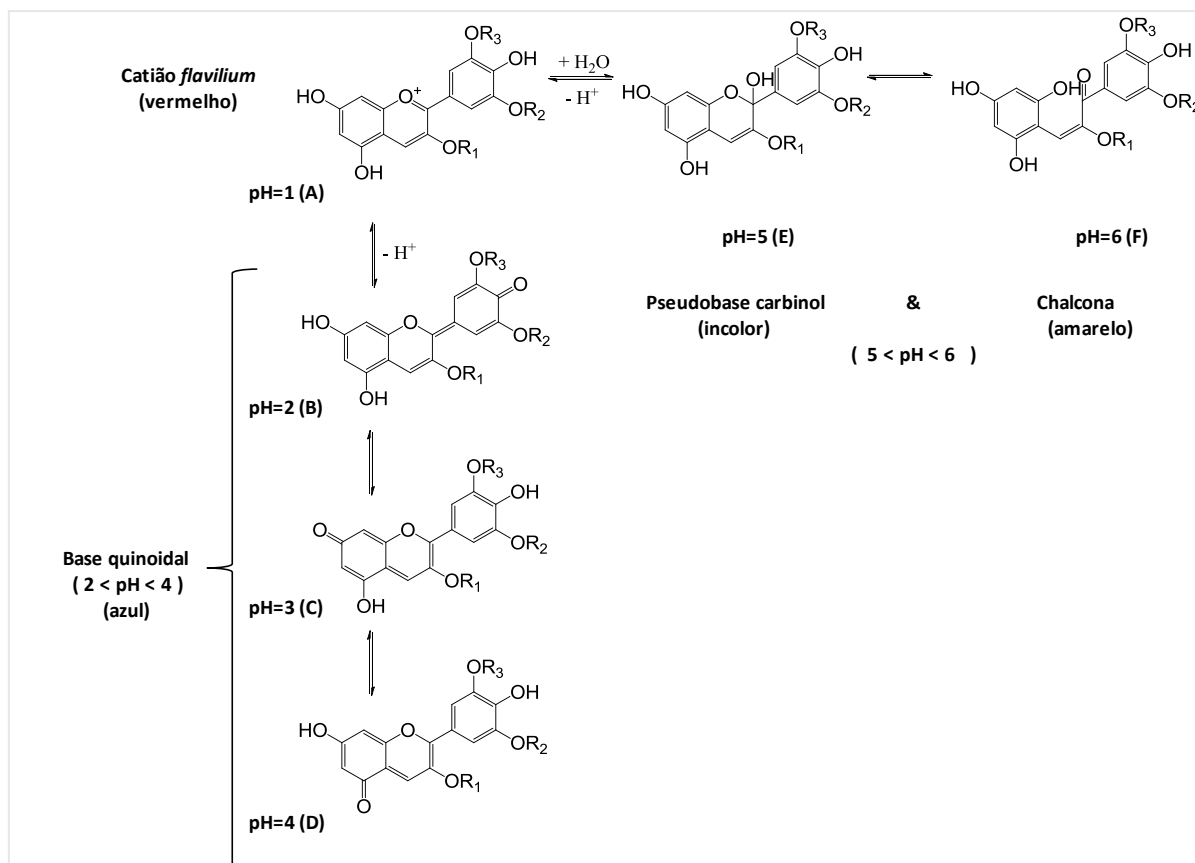


Fig. 6 - Formas químicas das antocianinas de acordo com o pH, onde: $R_1 = H$ ou glicosídeo; R_2 e $R_3 = H$ ou CH_3 . Adaptado de [9].

No caso específico da gama de pH de $4 < pH < 6$, conforme representado na Fig.7, dá-se a coexistência de quatro formas estruturais (catião *flavilium*, base quinoidal anidra azul, carbinol incolor e chalcona amarela), sendo o catião *flavilium* o responsável por estabelecer o equilíbrio entre as bases quinoidal e o carbinol (Fig.?- A, D, E e F, respectivamente) [8,9].

Isto acontece nos glicosídeos mais comuns – 3-glicosídeos e os 3,5-diglicosídeos – que mudam rapidamente para a forma mais estável (carbinol incolor) para que a posição 2 do catião *flavilium* seja completamente hidratada. O carbinol incolor, por sua vez, transforma-se numa estrutura aberta - pseudobase chalcona (incolor) - num equilíbrio mais lento, de forma a se estabilizar [5].

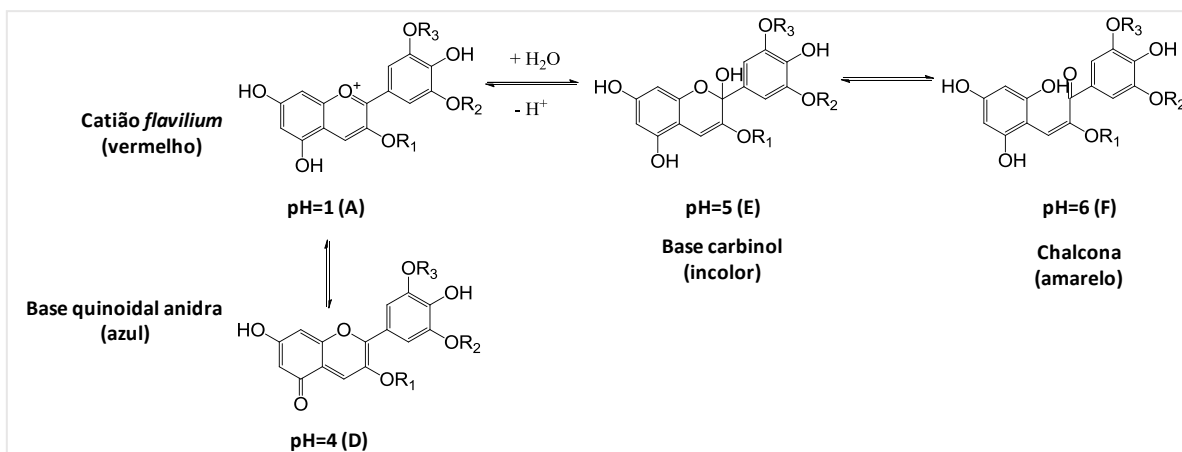


Fig. 7 – Quatro formas estruturais das antocianinas coexistentes na gama de pH de 4 a 6. Adaptado de [9].

Resumidamente, de acordo com o pH do meio, o catião *flavilium* (Fig.7A) em condições alcalinas é convertido na base quinoidal (Fig.7D) e finalmente na chalcona incolor (Fig.7F), via pseudobase carbinol (Fig.7E) [24].

A concentração destas quatro espécies coexistentes afecta, tanto a cor das antocianinas, como a sua estabilidade; contudo, as alterações de cor são mais significativas na região alcalina pois nesta região as antocianinas são mais instáveis [8,9,24].

É importante ressaltar que todas as alterações estruturais das antocianinas acima referidas só são possíveis aquando da existência de, pelo menos, um grupo OH livre. São os grupos OH dos carbonos 4' e 7 (assinalados na Fig.8) os responsáveis pelas alterações de cor características das antocianinas por serem facilmente desprotonados [11].

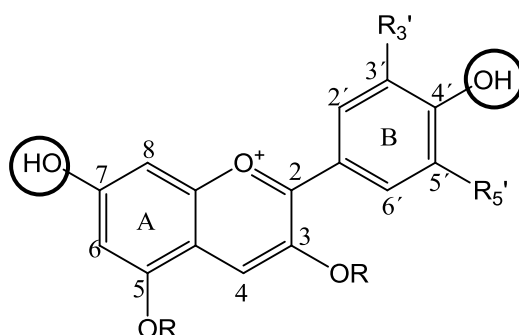


Fig. 8 – Estrutura do cromóforo das antocianinas, catião *flavilium*, quando estabilizado em meio aquoso.

Onde R normalmente é um açúcar ou um açúcar acilado. Adaptado de: [11].

1.6. Estabilidade

As antocianinas são caracterizadas pela elevada instabilidade inerente que apresentam; são, portanto, altamente susceptíveis a degradação quando isoladas [6,7,9,20].

As antocianinas têm um grande potencial de aplicação, entre eles, a utilização como corantes naturais substitutos dos corantes artificiais na indústria alimentar. Contudo, por serem altamente instáveis, na maioria dos casos, sofrem diversas reacções de degradação durante o processamento e armazenamento dos alimentos. Por isso, e apesar do seu grande potencial intrínseco, a sua utilização fica comprometida [6,9,24].

Posto isto, nos últimos tempos, a estabilização química destas moléculas tem sido, cada vez mais, o tema principal de alguns estudos que têm por base a sua utilização de acordo com os efeitos benéficos que apresentam [9].

A instabilidade das antocianinas reflecte-se, directamente, na sua cor. Quanto mais estável a antocianina se encontrar, mais intensa é a sua cor (na maioria dos casos vermelha) [1,10].

A estabilidade das antocianinas é afectada por diversos factores, e muitas vezes pela combinação deles. Os principais factores são: o pH do meio, a temperatura, a acção do oxigénio, a radiação/luz e a actividade da água [1,9,20].

Todavia existem outros factores não menos importantes: a estrutura química e a concentração da própria antocianina, os solventes nos quais as antocianinas se encontram, a degradação enzimática, a interacção com outros componentes, a presença de iões metálicos e co-pigmentos (co-pigmentação) [8–10,12,20].

1.6.1. Factores que influenciam a estabilidade

➤ pH do meio

A natureza iónica das antocianinas permite alterações na estrutura destas moléculas de acordo com o pH do meio, o que dá origem a diferentes cores e tonalidades, a pH's diferentes [1].

As antocianinas são altamente susceptíveis a degradação por alteração do pH do meio, revelando uma maior estabilidade em gamas de pH baixos (ácidos), contrariamente a valores de pH altos (básicos) [1,21].

O aumento do pH da solução resulta na formação de espécies incolores (carbinol e chalcona) em reacções de hidratação do catião *flavilium* [1,21].

➤ **Temperatura**

A estabilidade dos pigmentos presentes na comida, nos quais se incluem as antocianinas, diminui com o aumento da temperatura durante o processamento e o armazenamento dos alimentos. A degradação térmica dá origem a produtos castanhos, principalmente em condições aeróbias (na presença de oxigénio) [1].

Existem diversos estudos que reportam a degradação do conteúdo de antocianinas com o aumento da temperatura/aquecimento [1].

➤ **Acção do oxigénio**

O efeito do oxigénio na degradação das antocianinas não é directo; apenas aumenta o impacto de alguns dos outros processos de degradação. Por exemplo, a remoção do oxigénio protege as antocianinas da degradação térmica: estudos que testaram a combinação de diversos factores na deterioração da cor de vários sumos e antocianinas puras de diferentes bagas mostraram que a presença de oxigénio e temperaturas elevadas foi a combinação mais degradativa [1].

Estudos realizados em 2010 demonstraram que condições anaeróbias (ausência de oxigénio) são as melhores para manter a capacidade antioxidante inicial, bem como o conteúdo de antocianinas de morangos frescos armazenados no frio [1].

➤ **Radiação / Luz**

O efeito da radiação/luz sobre as antocianinas é verificado a dois níveis. Por um lado a radiação/luz é fundamental na produção das antocianinas, mas por outro lado, acelera a sua degradação [1].

A coloração conferida pelas antocianinas mantém-se mais estável em ambientes protegidos da radiação do que em ambientes expostos à luz, sendo esta observação já verificada passadas, apenas, 24 horas de armazenamento à temperatura ambiente [1].

A luz apresenta um efeito significativamente negativo sobre as antocianinas em condições de armazenamento; este efeito negativo é aumentado na presença de açúcares [1].

A degradação das antocianinas, induzida pela radiação, é influenciada pela planta a partir da qual as antocianinas são extraídas: foram observados comportamentos de degradação inconsistentes que estão relacionados com o conteúdo individual de antocianinas que constituem o extrato [1].

➤ Actividade da água

Estudos realizados mostraram que o aumento da proporção de água, numa mistura de acetonitrilo: água, resultou no surgimento de uma coloração verde, característica da dimerização do monómero *flavilium*. Este fenómeno ocorre devido à necessidade dos sais *flavilium* neutralizarem as suas próprias repulsões electrostáticas com as moléculas de água [9].

➤ Estrutura química da antocianina

No que diz respeito à estrutura química da antocianina, o aumento do grau de hidroxilação pode estabilizar a antocianidina. Contudo, a presença excessiva de grupos hidroxilo pode, igualmente, diminuir a estabilidade da molécula, tornando-a menos estável do que aquelas que possuem mais grupos metoxilo [9,10,20].

A acilação também tem influência na estabilidade das antocianinas: pode promover a estabilização da antocianina ao acilar o resíduo glicosídico a ácidos aromáticos ou alifáticos [7,8].

Assim, temos que:

- Antocianinas poliaciladas são mais estáveis do que as monoaciladas [10];
- Antocianinas aciladas com ácidos aromáticos são mais estáveis do que as aciladas a ácidos alifáticos [10];
- Antocianinas cujo ácido aromático acilado se encontra substituído no anel B são mais estáveis do que aquelas cujo ácido aromático se encontra no anel A [10].

➤ Concentração da antocianina

Estudos realizados por utilização de sais *flavilium* sintéticos mostraram que, aquando do aumento da concentração de sais *flavilium*, se dá um aumento da intensidade da cor da solução, sendo a coloração vermelha a favorecida [1,9,20].

Está comprovado que o contributo da concentração total de antocianinas na estabilidade da cor é maior do que o contributo dos diferentes tipos de antocianinas individuais [1].

➤ Solventes

Estudos realizados com o intuito de aferir a influência de solventes de diferentes naturezas químicas (nomeadamente acetonitrilo: água, etanol, dioxano e 2-butanona) mostraram que, em solventes próticos, os sais *flavilium* apresentaram uma coloração vermelha, contrariamente aos solventes apróticos cuja coloração apresentada era amarela [9].

Foi assim proposto que as espécies vermelhas e amarelas correspondem a monómeros e dímeros dos sais *flavilium*, respectivamente. Assim o aumento da concentração dos sais *flavilium* seria suficiente para a correcção da cor de amarelo para vermelho, ao favorecer a última [9].

Mas existe uma série de mecanismos complexos capazes de estabilizar as antocianinas, sejam eles de acção a curto prazo (copigmentação e auto-associação) ou a longo prazo (estabilização de pigmentos naturais por incorporação em materiais inorgânicos) [7,24].

➤ Actividade enzimática

A acção de enzimas é um dos factores que induzem a degradação das antocianinas. As enzimas mais comuns são as glicosidases que actuam ao nível da ligação covalente existente entre o resíduo glicosil e a aglicona, induzindo a degradação da antocianidina, por si só altamente instável [1].

As enzimas encontradas naturalmente nas fontes das próprias antocianinas também as degradam: as peroxidases e as fenolases (fenóis oxidases e as polifenóis oxidases, por exemplo) [1].

A inactivação das enzimas é, então, uma forma de aumentar a estabilidade das antocianinas [1].

➤ Formação par-ião

Do ponto de vista das interacções moleculares que as antocianinas podem estabelecer, pode ser verificado uma intensificação da cor de soluções que contenham antocianinas, aquando da adição de sais iónicos. Este fenómeno resulta da associação par-ião entre o anião mineral e o catião *flavilium*, dando-se um aumento da produção desta última forma estrutural [11].

1.6.2. Estratégias para aumentar a estabilidade

Existem alguns mecanismos aplicados na estabilização das antocianinas, sendo que os principais são as reacções de associação e o encapsulamento [1].

Outra estratégia para aumentar a estabilidade das antocianinas passa por imobilizá-las em materiais inorgânicos, através do processo de adsorção [7,8,21,24].

➤ Reacções de associação

A estabilidade das antocianinas é fortemente afectada quando estes compostos se associam a outros compostos. Consequentemente a cor das antocianinas também é afectada [1].

As reacções de associação das antocianinas são divididas em três tipos: auto-associação entre antocianinas; copigmentação (intramolecular ou intermolecular) e, por fim, a complexação com metais [1].

As reacções de associação das antocianinas são afectadas por diversos factores – solvente, radiação, pH, temperatura, estrutura e concentração de copigmentos e de antocianinas - mas, independentemente do tipo de associação envolvido, o resultado é um aumento na estabilidade das antocianinas [1].

- Auto-associação – quando duas ou mais antocianinas se associam. Este tipo de associação manifesta-se por um desvio positivo na lei de Beer pelo aumento da concentração das antocianinas [1].
- Copigmentação – a cor das antocianinas pode ser estabilizada, e até intensificada, por este tipo de associação. Este fenómeno manifesta-se por um aumento batocromático, ou seja, por um aumento no comprimento de onda de absorção máxima, da gama do visível para comprimentos de onda superiores. Isto também é conhecido pelo azulamento já que a cor das antocianinas passa de vermelho a azul, resultado das reacções de copigmentação [1,9,11].
- Complexação com metais – a associação de metais (tais como o magnésio, o alumínio, o ferro e o cobre) com o grupo *o*-OH das antocianinas estabiliza a cor de diversos produtos derivados de bagas [1].

➤ Encapsulamento

O encapsulamento de compostos biologicamente activos pressupõe a imobilização/incorporação dos mesmos no interior de partículas sólidas, normalmente microesferas. Esta técnica promove a estabilização e a protecção do composto activo e, ainda, a libertação controlada em sistemas de transporte de fármacos [1].

O encapsulamento permite que alguns pigmentos, de que são exemplo as antocianinas, se mantenham estáveis e aumenta o tempo de armazenamento destes compostos sensíveis à luz e à temperatura [1].

Existem diversas técnicas de encapsulamento utilizadas a nível industrial, mas muito poucas foram testadas no encapsulamento de antocianinas; de entre as testadas, e independentemente da técnica utilizada, todas aumentaram a estabilidade das antocianinas (directamente dependente da técnica aplicada) [1].

Adicionalmente, esta técnica de estabilização é vantajosa pois é altamente específica e acessível em termos de custos [1].

➤ Adsorção

Moléculas sensíveis, como as antocianinas, podem ser protegidas da degradação e, consequentemente, conservadas durante mais tempo, por imobilização em partículas inorgânicas laminares (que se dispõem em camadas/lâminas). Este tem sido, aliás, tema de muitas investigações no que concerne à estabilização de corantes naturais e ingredientes nutracêuticos [8,21].

A fim de proteger as antocianinas da degradação a que estão sujeitas, uma possível estratégia é a sua complexação/intercalação em materiais inorgânicos, de que são exemplo as argilas [8,24].

Sendo o catião *flavilium* a estrutura principal das antocianinas, é considerado o composto modelo das antocianinas. Então, e em condições ácidas, as antocianinas assumem a forma catiónica *flavilum*, sendo, por isso, esperada uma reacção de troca iónica aquando da sua intercalação nos materiais inorgânicos [24].

A complexação/intercalação de antocianinas em argilas é considerada promissora como técnica ecológica de produção de material colorido [24].

Actualmente tem havido um aumento de interesse neste tema e estão reportados alguns casos de sucesso na estabilização de antocianinas, de que é exemplo a

estabilização da antocianina malvidina-3-glucosídeo, extraída a partir da casca da uva, por intercalação em montmorilonite [8,21,24].

A estabilização de antocianinas em materiais inorgânicos tem, ainda, aplicação na área farmacêutica: promover a libertação controlada destes ingredientes funcionais, ao longo do tracto gastro-intestinal do corpo humano, numa utilização nutracêutica mais eficiente de suplementos [8,21].

1.7. Fontes de antocianinas

Geralmente pobres em gordura, os frutos e os vegetais apresentam na sua constituição quantidades significativas de fibras, vitaminas e minerais; apresentam também uma enorme quantidade de fitoquímicos com um grande potencial de actividade biológica para os humanos [18].

De entre as quatro principais classes de fitoquímicos, destacam-se os polifenóis nos quais estão incluídos os que contribuem para a cor dos frutos e vegetais, nomeadamente as antocianinas, e que correspondem aos compostos que aparecem em maior número [18].

Apesar das antocianinas se encontrarem presentes em muitas famílias de plantas e, consequentemente, em muitas plantas comestíveis, nem todas as plantas terrestres contêm antocianinas; nos cactos, nas beterrabas e nos amarantos estas moléculas são substituídas por outros corantes naturais denominados betalaínas [13].

Existem algumas espécies muito ricas em antocianinas: espécie *Vaccinium* (mirtilo, arandos e oxicocos), bagas *Rubus* (framboesas vermelhas e pretas, amoras, groselhas), cerejas, uvas, entre outras. Mas o recorde de maior quantidade de antocianina de que há registo foi verificado no revestimento das sementes de soja preta, apresentando um total de 2000 mg/100 g [13].

Outra grande fonte de antocianinas é o açaí que apresenta cerca de 320 mg de antocianina por 100 g de produto, sendo a cianidina-3-glucosídeo a antocianina individual maioritária, em quantidades de, cerca de, 10 mg/100 g de antocianina [13].

O teor de fitoquímicos presentes numa planta depende de diversos factores, nomeadamente:

- da própria planta (com os frutos e serem mais concentrados do que as folhas) [18];

- do genótipo (influenciando não só o teor total de cada classe de fitoquímicos, como também a proporção de químicos individuais) [18];
- das diferenças na origem e preparação das amostras [13];
- das diferenças nos métodos de extracção e determinação do conteúdo total de antocianinas [13].

Por todos os factores acima mencionados, os valores representados na tabela 2 não podem ser comparados entre si; na referida tabela estão exemplificadas algumas das plantas comestíveis consideradas fontes de antocianinas, bem como o respectivo teor de antocianinas encontrado em cada uma [13].

Tabela 2 – Plantas comestíveis fontes de antocianinas e respectivo conteúdo de antocianinas (mg/g).

Adaptado de [13].

Plantas comestíveis fontes de antocianinas	Teor de antocianina (mg/g de planta)
Beringela	750
Groselha preta	130-400
Groselha vermelha	80-420
Amora	83-326
Mirtilo	25-497
Mirtilo vermelho	60-200
Cereja	350-400
Laranja	~200
Rabanete	11-60
Framboesa	10-60
Uva vermelha	30-750
Cebola vermelha	7-21
Vinho tinto	24-35
Morangos	15-35

No caso específico das culturas de uvas, o teor e a composição de antocianinas variam bastante de acordo com diversos factores: espécie, variedade, maturação, região de cultivo e as condições de cultivo. Mas para que se verifique o máximo de produção de antocianinas nas uvas é fundamental que a exposição à radiação solar seja moderada [7].

1.7.1. Bagas

A nível da alimentação, as bagas correspondem à principal fonte de antocianinas, que são responsáveis pela atribuição das diversas e vibrantes cores características [18]. Aliás, foi este o motivo pelo qual as antocianinas foram a temática principal num simpósio sobre os benefícios de saúde advindos do consumo de bagas, decorrido em 2007 [13].

Por “bagas” denominam-se frutos como: amoras, uvas, mirtilos (pretos e vermelhos), morangos, framboesas, groselhas (preta, vermelha e branca), entre outros [18]. O consumo da maior parte destas bagas, mundialmente, é diário, sendo que (apesar de algumas serem cultivadas) a maior parte é consumida pela colheita selvagem; colheita destes frutos é realizada de acordo com o grau de desenvolvimento das bagas: no nível máximo de maturação é atingido o auge de biossíntese das antocianinas [17,18].

Apesar de, na maioria dos casos, o perfil de antocianinas de uma determinada espécie ser característico, existem algumas antocianinas consideradas principais, por serem comuns a muitas das bagas (representadas na Fig.9) [18].

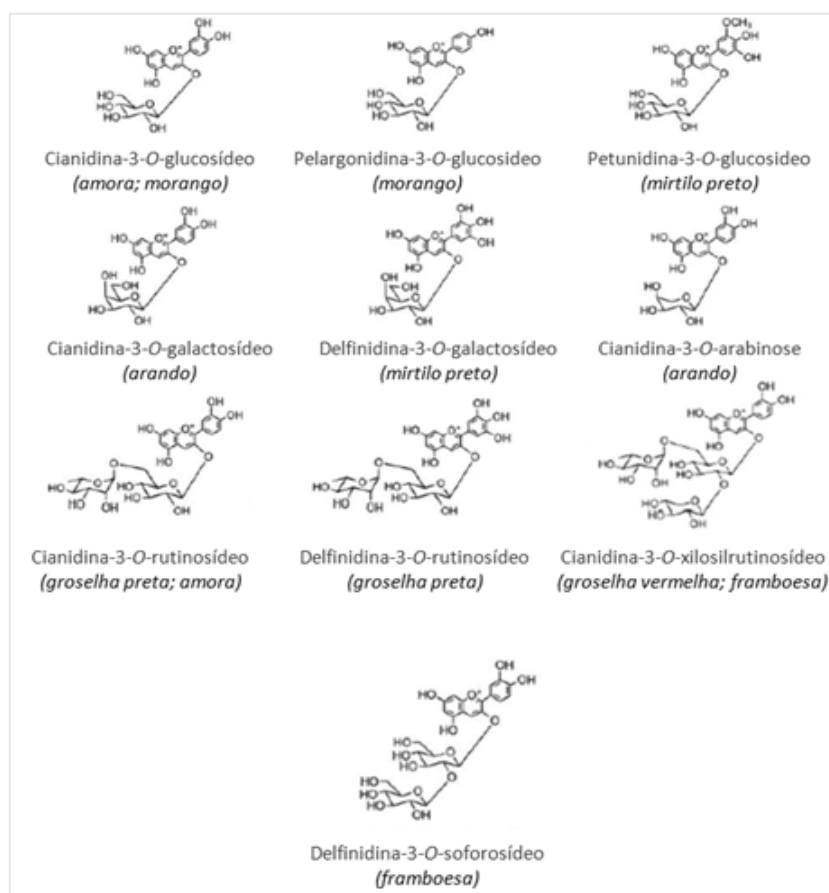


Fig. 9 – Estruturas das principais antocianinas encontradas nas bagas. Adaptado de [18].

Enquanto alguns frutos, como arandos e amoras, apresentam derivados de, apenas, uma antocianina (Cy), nos mirtilos e nas groselhas negras é possível verificar a existência de uma grande variedade de antocianinas diferentes; já nas framboesas e amoras, as antocianinas mais comuns são derivados da Cy, em contraposição aos morangos cujos derivados da Pg são os maioritários. No que diz respeito aos mirtilos pretos, as antocianinas maioritárias são a delfinidina-3-*O*-galactosídeo e a petunidina-3-*O*-glucosídeo, apesar de coexistirem outras antocianinas [18].

Na maioria dos casos, o perfil de antocianinas de uma determinada espécie é característico; mas os arandos, apesar de pertencerem à mesma família dos mirtilos pretos (família *Ericaceae*), apresentam como antocianinas maioritárias, apenas, derivados de Cy. O mesmo acontece nos morangos, amoras e framboesas que, apesar de pertencerem à família *Rosaceae*, apresentam todos um conteúdo de antocianinas diferente [18].

As bagas, apesar de serem ótimas fontes de antocianinas, em geral, tendem a se degradar com muita facilidade, daí a necessidade de serem processadas com o intuito de aumentar o tempo de conservação; um exemplo dos métodos de processamento aplicados é a redução a compota. Neste sentido, a taxonomia é vantajosa já que através dela é possível a detecção de possíveis adulterações de produtos processados (sumos e vinhos, por exemplo) [18].

1.8. Benefícios para a saúde humana

As antocianinas, para além do potencial que apresentam enquanto pigmentos naturais e saudáveis, apresentam outras propriedades benéficas para a saúde humana. Assim, ao longo dos últimos anos, tem sido verificado um aumento no interesse destes compostos, tanto na alimentação como na preparação de nutracêuticos, já que não existem documentos que relatem algum tipo de toxicidade inerente a estes [5–7,9].

Alguns dos benefícios das antocianinas incluem vários tipos de actividade biológica (antioxidante, antimicrobiana, antiviral e antimutagénica), efeitos preventivos ao nível de doenças hepáticas e doenças cardiovasculares, propriedades anticancerígenas e anti-inflamatórias; efeitos protectores contra doenças crónicas e degenerativas, entre outros [7,19].

A propriedade mais significativa destes compostos naturais é a actividade antioxidante, assumindo um papel importante na prevenção de doenças neurais e cardiovasculares, doenças inflamatórias, envelhecimento (envelhecimento prematuro),

doenças neurodegenerativas (doença de *Alzheimer*), cancro (leucemia e linfomas), diabetes (no aumento da produção de insulina), entre outras [8,9].

Muitas são as aplicações industriais das antocianinas e, conseqüentemente, dos seus benefícios [11].

Na indústria alimentar, os benefícios das antocianinas para os humanos advêm, maioritariamente, do consumo de alimentos, suplementos alimentares e nutracêuticos ricos neste tipo de compostos. Está comprovado que o consumo de vinho, por exemplo, pode aumentar a actividade antioxidante no plasma [15,17].

Também na cosmética a utilização das antocianinas é vantajosa: para além de reflectirem a luz azul e vermelha, também absorvem a perigosa radiação UV-B, o que as torna excelentes protectores solares naturais da planta. Aliás, é com este propósito que as folhas mais novas/tenras das plantas utilizam as antocianinas já que ainda não têm a capacidade de produzir ceras de protecção permanente [11,13].

1.8.1. Capacidade antioxidante

➤ Stress Oxidativo e antioxidantes

As células activas dos organismos, em condições fisiológicas normais, e como resultado do metabolismo aeróbio, produzem espécies de oxigénio reactivas (*reactive oxygen species*, ROS); estas alojam-se em organelos específicos, nomeadamente as mitocôndrias, pois resultam da redução do oxigénio molecular (O_2) a água (H_2O), numa série de transferências de electrões [16,17,25].

Os ROS estão envolvidos no processo natural de envelhecimento, decorrente da perda de funções dos sistemas de regulação do oxigénio dos organismos resultando na indução de stress oxidativo nas biomoléculas [17,25].

Os organismos são naturalmente dotados de mecanismos de defesa/desintoxicação contra estas espécies, nomeadamente: enzimas de eliminação de radicais livres e, ainda, antioxidantes celulares. Factores como doenças, o próprio envelhecimento e químicos ambientais estão na origem da problemática, propriamente dita, dos ROS: a ruptura do equilíbrio produção/desintoxicação do organismo, quer seja por inibição das defesas celulares antioxidantes e/ou por estimulação da formação destas espécies [16].

Dá-se, assim, uma acumulação destas espécies e os tecidos celulares são expostos a condições de stress oxidativo, resultando na interrupção dos processos celulares normais, por falta de equilíbrio entre os efeitos pró e antioxidantes [16,17,25].

Do stress oxidativo a que as células são expostas, resultam danos oxidativos que, por sua vez, dão início a uma série de processos degenerativos que podem se tornar patogénicos, originando: doenças neurodegenerativas, diabetes, cancro, patologias hepáticas, doenças cardiovasculares e envelhecimento precoce [16,17,25]. Em última instância, dá-se a destruição celular, para além de outras respostas citotóxicas [16].

O stress oxidativo, e consequentes patologias, podem ser parcialmente controlados pela acção de compostos antioxidantes naturais, presentes em alimentos que constituem a alimentação diária. Assim sendo, é assumido que a terapêutica baseada na utilização de antioxidantes é a mais eficaz na prevenção e/ou controlo do stress oxidativo [17,25].

Os antioxidantes são tanto melhores quanto maior for a sua tendência para se oxidar/reduzir pois podem doar um electrão livre ou um átomo de hidrogénio ao radical livre, estabilizando-o e, consequentemente, neutralizando-o [9].

Os polifenóis, independentemente da sub-classe, apresentam elevada capacidade antioxidante, resultado da sua facilidade em doar átomos de hidrogénio ou electrões, bem como da habilidade que apresentam em estabelecer interacções com proteínas (estas interacções são tão específicas que lhes permite modelar a actividade da enzima e, assim, actuar como inibidores de enzimas produtoras de ROS) [25].

➤ **Capacidade antioxidante das antocianinas**

No caso específico dos flavonóides, dos quais fazem parte as antocianinas, e apesar do seu baixo peso molecular, exibem elevada actividade antioxidante, e são capazes de reduzir o stress oxidativo de diversos mecanismos [9,17].

As antocianinas, devido à actividade antioxidante que exibem, têm um papel vital na prevenção de patologias cardiovasculares e neurais. São também eficazes na prevenção de doenças como a diabetes e o cancro, estando mesmo reportados vários casos de sucesso no tratamento de cancros [9].

Estudos realizados em extractos de *roselle* – utilizada na medicina tradicional para o tratamento da hipertensão, doenças inflamatórias, cancro, patologias cardiovasculares e nervosas, entre outras - indicaram que são as antocianinas a principal fonte de actividade antioxidante [26].

A actividade antioxidante das antocianinas é verificada a dois níveis: na eliminação de radicais livres propriamente ditos (por doação de um átomo de

hidrogénio fenólico) e na prevenção da formação de radicais livres (ao actuarem como quelantes de metais, principalmente ferro) [9,11].

Como já referido anteriormente, os antioxidantes são tanto melhores quanto maior for a sua tendência para reduzir. Então, de entre as antocianinas mais comuns, é espectável que a Cy, a Dp e a Pt apresentem maior capacidade antioxidante. Já no caso da Pg, Pn e da Mv o mesmo não se verifica pois não são fáceis de oxidar [9].

A capacidade antioxidante de um extracto é directamente proporcional ao conteúdo total de antioxidantes que apresenta. Esta é a conclusão principal de estudos realizados em amoras, framboesas e morangos [9].

➤ **Testes de capacidade antioxidante**

A fim de avaliar a propriedade antioxidante inerente a alguns compostos e misturas complexas (tais como extractos naturais), são utilizados vários métodos, discriminados de acordo com o seu fundamento [27].

Então, enquanto os ensaios de actividade antioxidante são, na sua maioria, competitivos e baseiam-se na transferência de átomos de hidrogénio, por outro lado, os ensaios de capacidade antioxidante total baseiam-se na transferência não-competitiva de electrões [27].

Assim sendo, sem que haja informação detalhada acerca da estrutura dos compostos antioxidantes a serem testados, torna-se difícil a interpretação dos resultados e o estabelecimento de mecanismos e padrões de reactividade [27].

Por exemplo, os ensaios do DPPH (2,2-difenil-1-piril-hidrazil) são, geralmente classificados pelo mecanismo de transferência de electrões. Mas este radical pode ser neutralizado segundo ambos os mecanismos: via transferência do átomo de hidrogénio, ou via transferência de electrões por redução directa [27].

Proposto por Blois, há mais de 100 anos, para a quantificação do conteúdo antioxidante, e mais tarde utilizado como reagente fenólico, o DPPH consiste num radical livre estável (DPPH \cdot), representado na Fig.10A, com $\lambda_{\text{máx}} = 516$ [27].

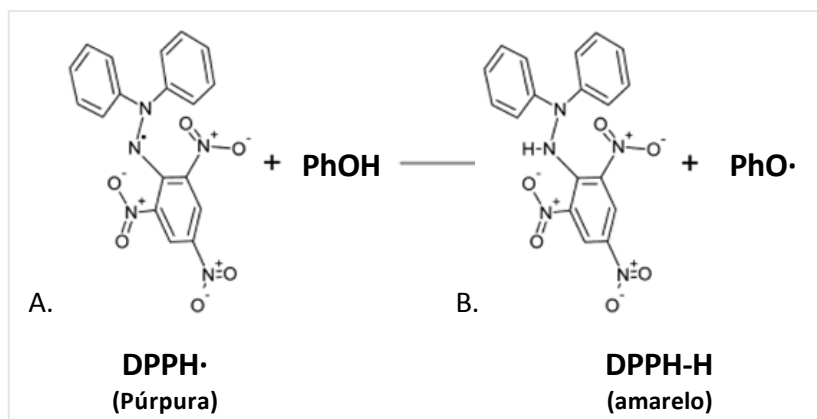


Fig. 10 - Representação da reacção química de neutralização do DPPH. Adaptado de [27].

Por ser um ensaio simples e de baixo custo, o método do DPPH apresenta uma vasta gama de aplicações em muitos laboratórios convencionais. Por isso, surge na literatura com diversas adaptações; mas é o método de *Brand-Williams et. al.* o mais utilizado como referência para muitos investigadores [27].

Este método consiste na dissolução dos cristais de DPPH em etanol ou metanol, a uma concentração cuja absorvância seja de, aproximadamente, 1. Posto isto, uma alíquota de antioxidante é adicionada ao alvo do estudo, a mistura é incubada por, cerca de, 30 minutos, ao fim dos quais é lida a absorvância final [27].

O DPPH é classificado como cromogénico pois no decorrer da reacção verifica-se uma alteração de cor. Assim a solução inicial (púrpura) dá lugar a uma solução final (amarela), resultado da redução do DPPH• (Fig.10A) a DPPH₂ (Fig.10B), por transferência do átomo de H do antioxidante [16,27].

Conforme representado na Fig.11, a reacção de redução do DPPH• a DPPH₂ pode ser explicada de acordo com o mecanismo de transferência do átomo de hidrogénio. Contudo o mecanismo de transferência de electrões-livres não pode ser negligenciado [27].

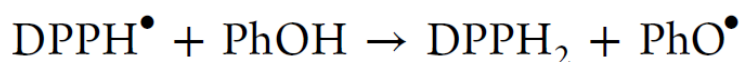


Fig. 11 - Equação de redução do DPPH•, a DPPH₂, segundo o mecanismo de transferência do átomo de hidrogénio [27].

A extensão da reacção é dada pela diferença entre a absorvância final e inicial (Af-Ai), e a actividade antioxidante pode ser expressa em:

- IC50 - concentração total de antioxidante necessária para reduzir a absorvância do DPPH· inicial para metade) [27];
- Equivalentes de Trolox – capacidade antioxidante da solução em estudo, comparativamente à descoloração originada pelo composto de referência Trolox [27]. Este resultado é geralmente expresso em milimolar de equivalente de trolox, obtido através de uma recta de calibração.

O Trolox – ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico – é um composto hidrossolúvel análogo da vitamina E e ganhou posição de destaque enquanto composto de referência em ensaios de actividade antioxidante (Fig.12). A eficácia deste composto, quer em sistemas lipofílicos quer em sistemas hidrofílicos, é uma das principais vantagens deste ácido carboxílico [28,29].

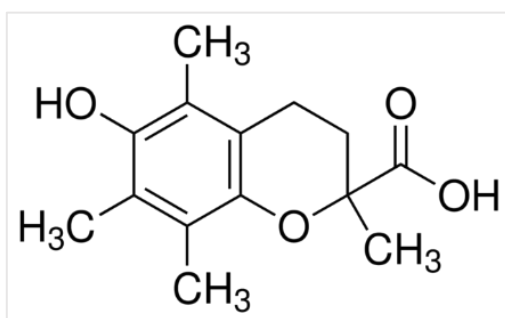


Fig. 12 – Estrutura química do Trolox. Adaptado de [29].

Através deste método, não é possível distinguir e classificar os antioxidantes presentes uma vez que esta metodologia expressa apenas a extensão da reacção, segundo a estequiometria da reacção, e não a taxa da reacção. Para isso seria necessário monitorizar, ao longo da reacção, a perda de absorvância de várias concentrações do antioxidante [27].

2. ADSORÇÃO

2.1. Adsorção enquanto técnica de estabilização

Os compostos polifenólicos, e graças às suas propriedades, por um lado, são interessantes para a saúde humana mas, por outro lado, são instáveis, pouco solúveis em água e apresentam mau sabor. Assim sendo, e para que a sua utilização seja viável, é fundamental a formulação de um produto final capaz de manter a integridade destes compostos até ao seu consumo/consumidor final, dissimular o mau sabor característico e aumentar a solubilidade em água (e consequentemente a biodisponibilidade) [25].

Neste sentido, a adsorção constitui uma técnica útil na aplicação de compostos polifenólicos (e não só) já que promove a imobilização de moléculas sensíveis em materiais inorgânicos, protegendo-os da degradação e aumentando o seu tempo de armazenamento [21].

No caso específico das antocianinas, por serem corantes naturais solúveis em água, são fortes candidatos a serem utilizados como substitutos dos corantes sintéticos; mas estes compostos polifenólicos são instáveis, daí que a sua estabilidade e estabilização são temáticas de grande importância [21,24,30].

Neste sentido, a adsorção pode ser utilizada como técnica de estabilização de antocianinas; vários estudos reportam a estabilização destes corantes orgânicos por complexação com materiais inorgânicos [24].

De entre os materiais inorgânicos reportados, as argilas representam bons candidatos na estabilização de compostos nutracêuticos, já que são excipientes comuns em produtos farmacêuticos para aplicação oral e tópica; encontra-se reportada a estabilização de antocianinas em argilas montmorilonites e zeolites [21,24].

A complexação/intercalação das antocianinas em argilas torna-se assim a chave para o desenvolvimento de materiais corantes ecológicos [24].

2.2. Definição de adsorção

Entende-se por adsorção a técnica de imobilização de compostos orgânicos dissolvidos numa solução, pela sua retenção e concentração na superfície interna e externa de um material poroso [5,31,32]. Daqui resulta um soluto – *sorbato* - e uma *fase adsorvida* que corresponde às moléculas adsorvidas na superfície do sólido poroso (*adsorvente*) [31].

Para que seja verificada adsorção, é imperativo que haja afinidade entre as moléculas da mistura e a superfície do adsorvente [31].

De uma forma muito concisa, a adsorção consiste num processo ao longo do qual os poros do adsorvente são preenchidos por moléculas de sorbato. Quando a capacidade máxima do adsorvente é atingida, é verificada uma situação de equilíbrio: a concentração da fase adsorvida e a concentração da solução mantem-se constante [31].

A capacidade de adsorção e a cinética do processo está directamente dependente de alguns parâmetros físico-químicos externos, nomeadamente: pH, temperatura, compostos concorrentes presentes em solução e, ainda, as características do próprio adsorvente (estrutura química, tamanho das partículas, porosidade, área de superfície e distribuição do volume de poros) [5].

Do ponto de vista industrial, e dependendo da aplicação, a adsorção pode se tornar um processo complexo. A sua planificação e *design* tem de ter em conta aspectos como o tipo de solução, a metodologia de contacto entre o sólido e a solução, a escala a que a metodologia é realizada, entre outras [31,33].

Contudo, e independentemente de todos os aspectos acima mencionados, as adsorções requerem características comuns dos adsorventes: a forma das partículas e uma grande área de superfície [31,33].

2.3. Fundamentos da adsorção

O processo de adsorção tem por base a distribuição de um soluto entre duas fases: uma fase sólida e uma fase líquida. É atingido o equilíbrio de sorção quando a concentração do soluto adsorvido no interior se encontra em balanço dinâmico com o soluto adsorvido à superfície [5,31].

O processo de adsorção de um soluto em matrizes sólidas tem sido objecto de extensivos estudos, e as suas bases teóricas podem ser descritas como uma sequência de acontecimentos. Trata-se, por isso, de uma análise fenomenológica, que descreve as principais etapas da adsorção do soluto: transferência externa, interna e equilíbrio [5,31].

Os principais passos do processo de adsorção, representados na Fig.13, são:

1. Transporte externo do soluto, do meio para a “fronteira” (Fig.13(1A));
2. Transferência do soluto da “fronteira” para a superfície do adsorvente/ entrada do poro (Fig.13(1B));

3. Transporte interno da superfície/ entrada do poro, para os sítios-ativos internos (Fig.13(2));
4. Adsorção do soluto aos sítios-ativos da superfície interna do poro (Fig.13(3)) [5,31].

No que diz respeito à primeira etapa do processo de adsorção, esta pode ser desconsiderada desde que seja mantida uma velocidade de agitação suficiente para que seja evitada a distribuição heterogénea do soluto e do adsorvente, em solução [5].

Também a quarta etapa do processo é negligenciável na cinética global da adsorção pois, como bem documentado, esta etapa ocorre rapidamente [5].

Refira-se que a taxa/velocidade total do processo de adsorção depende do rendimento individual de cada etapa, durante o transporte e adsorção do soluto, do meio reaccional para o interior dos poros do adsorvente. É um processo de equilíbrio que, normalmente, apresenta uma taxa elevada [31].

A difusão externa e intrapartícula são consideradas as etapas limitantes do fenómeno de adsorção [5].

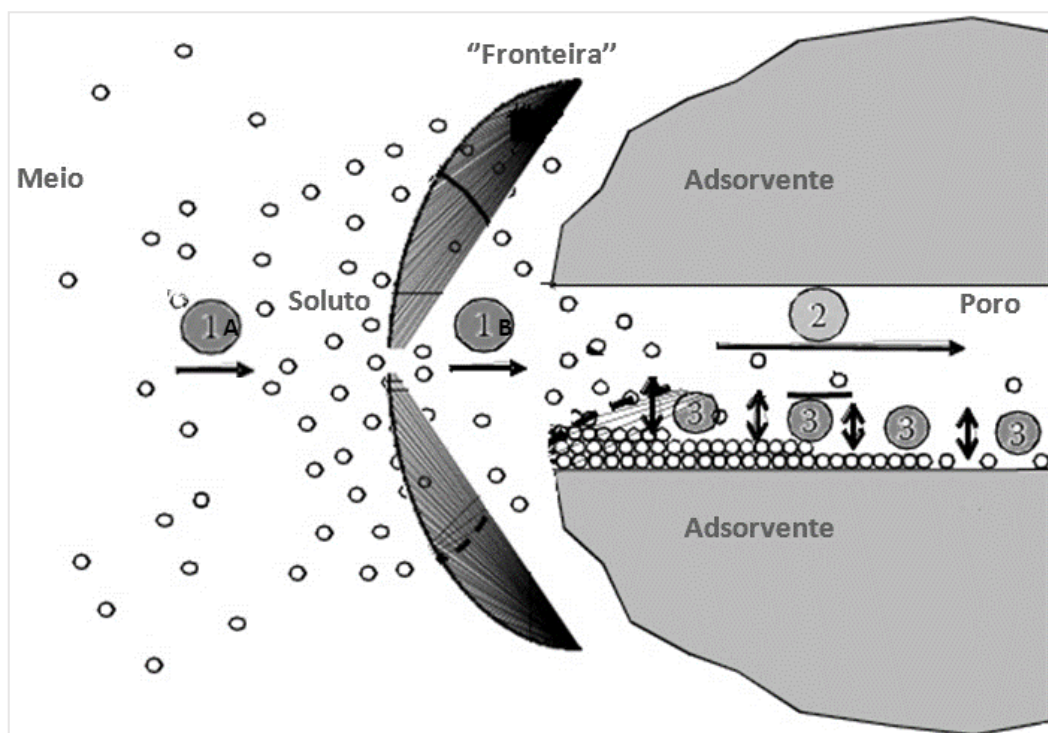


Fig. 13 – Ilustração representativa das principais etapas do processo de adsorção: 1 A – Transporte externo do soluto da solução-meio para a “fronteira”; 1 B – Transporte do soluto da “fronteira” para a entrada do poro do adsorvente; 2- Transporte interno da entrada do poro do adsorvente para os sítios-ativos do mesmo; 3- Adsorção do soluto aos sítios-ativos da superfície interna do adsorvente. Adaptado de: [31]

Nos processos de adsorção, são muitas as variáveis operacionais que influenciam todo o processo [34]. A capacidade de adsorção de um sistema é altamente dependente de:

- propriedades do adsorvente – porosidade, área de superfície e tamanho das partículas [34];
- propriedades do sorbato – estrutura, solubilidade em água, carga iónica, grupos funcionais, pKa, polaridade, funcionalidade, peso molecular e tamanho molecular [34];
- condições da solução – solvente, pH, temperatura, força iónica, concentração do soluto e a competição entre solutos [34];
- interacções na fronteira sólido-líquido [34];
- condições experimentais [34].

A influência da temperatura no processo pode ser verificada a dois níveis: por um lado, diminui viscosidade da solução (aumentando a taxa de transporte ao longo da fronteira externa, bem como ao longo dos poros), por outro lado, altera a estrutura do adsorvente e consequentemente a capacidade do mesmo. Mas a temperatura também pode ser desvantajosa: temperaturas elevadas promovem interacções irreversíveis [34].

No caso de adsorções a partir de soluções líquidas, são as mais complexas pois estão envolvidos dois componentes. Neste tipo de adsorções, tanto o soluto como o solvente são adsorvidos, ainda que em extensões diferentes, sendo que na maioria destes processos o componente de interesse é o soluto. Estão assim envolvidas interacções entre soluto-superfície, solvente-superfície e ainda solvente-soluto; todas influenciam a eficácia do processo de adsorção [35].

Adicionalmente, adsorções a partir de misturas complexas, de que são exemplo os extratos, constituem processos problemáticos. Nestas situações, a solubilidade do composto de interesse influencia a eficácia do processo na medida em que quanto menos solúvel for o composto, melhor a sua separação por adsorção [34,35].

2.3.1. Etapas da adsorção

2.3.1.1. Transporte externo do soluto

A primeira etapa do processo de adsorção - transporte externo do soluto do meio para a “fronteira” - ocorre aquando da difusão molecular ao longo da “fronteira” existente em torno do adsorvente. Isto é promovido pela diferença de concentração que se verifica entre a solução reaccional e a superfície do adsorvente [31].

Assim, o sorbato é transportado e a concentração ao longo da “fronteira” diminui. Este transporte dá-se a uma velocidade directamente proporcional ao coeficiente de transferência externa de massa [31].

Neste sentido, o coeficiente de transferência de massa depende de vários factores: propriedades da solução (densidade e viscosidade), interferentes na solução, diâmetro das partículas do soluto e a difusão molecular do soluto no meio [31].

Também a esfericidade é um parâmetro a ter em consideração nesta primeira etapa da adsorção; este parâmetro tem em conta a diferença entre a área da partícula de soluto e a área de uma esfera com o mesmo volume [31].

2.3.1.2. Transporte interno

Uma vez que o sorbato atravessa a “fronteira” e atinge a superfície do poro do adsorvente, verifica-se a difusão ao longo deste, num processo de transporte interno, descrito por diferentes mecanismos [31]:

1. Difusão molecular ao longo do poro (devido à diferença de concentração da solução que preenche o poro (Fig.13 (2)));
2. Difusão molecular ao longo da superfície adsorvida (Fig.13 (3)) [31].

No que diz respeito ao primeiro mecanismo, o que se verifica é que o soluto ao migrar ao longo do poro, colide com outras moléculas e/ou contra as paredes do poro; contudo, apenas é considerado difusão molecular quando as colisões mais frequentes são aquelas entre o soluto e o sorbato. Por outro lado, existem casos em que as colisões mais frequentes são as colisões entre o soluto e o poro do adsorvente (isto acontece quando o diâmetro do poro é menor do que o espaço livre para migração) [31].

Quando a concentração do sorbato é elevada e os poros são pequenos, verifica-se o segundo mecanismo de transporte interno. O que acontece é que, nestes casos, a

interacção entre o soluto e o adsorvente não é muito forte, resultando numa maior migração do soluto ao longo do poro, do mais concentrado para o menos concentrado. Este é o motivo pelo qual o coeficiente de difusão à superfície aumenta com a área de contacto [31].

Os mecanismos acima mencionados podem ocorrer em simultâneo, já que os adsorventes apresentam poros de diferentes diâmetros e tamanhos [31].

2.3.1.3. Equilíbrio

A etapa de equilíbrio do processo de adsorção traduz-se na diferença da capacidade, de um determinado adsorvente, atingir o equilíbrio com cada um dos componentes. Esta é, igualmente, a base da maioria dos processos de separação por adsorção [31].

Nesta etapa, a concentração da fase adsorvida (kg/kg^{-1} de adsorvente) está relacionada com a concentração do soluto em solução (kg/m^{-3} de solução), sendo que esta relação é específica para cada sistema sorbato/adsorvente, e altamente dependente da temperatura [31].

Ao gráfico que representa a concentração da fase adsorvida vs. concentração do soluto em solução, a uma temperatura constante, dá-se o nome de isotérmica de adsorção [31].

Por outras palavras, uma isotérmica pode ser definida como a relação de equilíbrio existente entre o soluto e o adsorvente, a uma dada temperatura [5].

A realização de estudos de equilíbrio de adsorção tem, então, por objectivo a indicação da capacidade do adsorvente, que é descrita por meio de uma isoterma de adsorção [5].

2.3.2. Tipos de interacções moleculares

Como já mencionado, o ponto crucial no processo de adsorção é que exista afinidade entre o adsorvente e o componente a ser separado. Está, assim, implícita a obrigatoriedade de existência de interacções entre ambos [5,31].

Por outras palavras, a afinidade do adsorvente pelo composto a ser separado é o resultado da existência de interacções entre ambos que, de acordo com a intensidade com que são estabelecidas, o processo pode ser classificado de natureza física ou química [31,36].

➤ **Adsorção física**

Neste tipo de adsorção, as forças de interacção são, geralmente, hidrofóbicas e fracas – van der Waals ou pontes de hidrogénio – e são produzidas à temperatura ambiente, num processo rápido com baixa energia de activação [5,31].

Neste tipo de adsorção, verifica-se a formação de várias camadas de sorbato [31].

Uma molécula adsorvida fisicamente pode ser facilmente dessorvida, por redução da concentração ou por aumento da temperatura [31].

➤ **Adsorção química**

Na adsorção química, as interacções existentes são idênticas às envolvidas nas ligações químicas, ocorrendo numa vasta gama de temperaturas e requerem uma energia de activação muito maior [31].

A organização do sorbato neste tipo de adsorção é restrita a uma monocamada [31].

A dessorção de uma molécula quimicamente adsorvida é mais difícil, implicando um grande aumento de temperatura [31].

Na indústria, e respectivas aplicações da adsorção, o mais frequente é que as moléculas estejam fisicamente adsorvidas. Contudo, na maioria dos casos é difícil perceber se a adsorção química ocorre; isto porque, pode acontecer, que a primeira camada (da multicamada da adsorção física) esteja quimicamente adsorvida ao adsorvente e, as sucessivas, fisicamente adsorvidas [31].

Independentemente do tipo de adsorção que ocorra, a estrutura original do adsorvente não é alterada visto que as moléculas adsorvidas localizam-se, maioritariamente, entre as ligações insaturadas das lâminas (em adsorventes laminares) e, por isso, não desenvolvem uma estrutura tridimensional [36].

2.4. Adsorventes

Na maior parte dos processos de adsorção é utilizado um agente de separação de massa – *adsorvente* – cujas características e qualidade determinarão, directamente, a eficiência do processo em si [31,35]. Então, o adsorvente representa um dos factores influenciadores do processo de adsorção [31].

Neste sentido, a capacidade, a selectividade e a resistência mecânica do adsorvente escolhido são aspectos cruciais para a eficiência da operação; mas sendo a adsorção um fenómeno superficial o parâmetro mais importante é a área de superfície por unidade de massa (área específica) do adsorvente [31].

Daqui tem resultado o desenvolvimento de vários métodos de manufacturação que sintetizam adsorventes com áreas específicas de 1500 m²/g; áreas de superfície desta magnitude só são possíveis devido à elevada porosidade das partículas [31].

A porosidade do adsorvente é um parâmetro que pode ser determinante na selectividade da adsorção, permitindo a selecção das moléculas de interesse em função do seu tamanho [31].

No que diz respeito ao tamanho do poro, e segundo a IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*), os adsorventes são classificados em: microporosos (diâmetro < 2 nm); mesoporosos (2 < diâmetro < 50 nm) e macroporosos (diâmetro > 50 nm). Neste seguimento, os adsorventes podem ser constituídos por, até, 85% de volume de partículas micro e mesoporosas, já que todos os adsorventes úteis apresentam microporos [31,35,37]. É exactamente esta a razão pela porque a quantificação relativa da distribuição do tamanho de poro é crucial na caracterização dos adsorventes, especialmente no caso dos microporos [35].

A natureza dos adsorventes é outro dos parâmetros que os classifica. Posto isto, os adsorventes podem ser sólidos de origem natural ou artificial e, consequentemente, apresentam propriedades distintas [31,35]. Muitas têm sido as investigações em torno do desenvolvimento de métodos de produção de novos materiais sintéticos. O principal objectivo é que estes adsorventes apresentem melhores estruturas, isto é, maior área de superfície, e propriedades que melhorem a capacidade, a especificidade, e a regeneração do adsorvente [31].

Do ponto de vista comercial, os adsorventes são vendidos sob a forma de grânulos, pastilhas, flocos ou pós, cujos tamanhos variam entre os 50 μ m e os 1,2 mm, e devem apresentar algumas características [31]:

- Elevada selectividade [31];
- Capacidade para melhorar a eficiência da separação [31];
- Envelhecimento prolongado [31];

- Resistência (para que a agitação e o transporte não leve à ruptura do sólido) [31];
- Fácil de regenerar e amigo do ambiente [31].

2.5. Processos de adsorção aplicados na indústria

Do ponto de vista comercial, o processo de adsorção pode ser aplicado segundo diversos e diferentes métodos de operação: em tanques com agitação, em colunas com fluxo contínuo, entre outras [31].

A nível industrial, apesar da maioria dos processos serem realizados em colunas, quando se tratam de processos em fase líquida, frequentemente, o método mais utilizado é o tanque com agitação [31].

Tal como representado na Fig.14, a operação é realizada num tanque, que contém a mistura líquida, à qual é adicionado o adsorvente em pó que, em contacto com a fase líquida, forma um colóide. A agitação é accionada, e o soluto é adsorvido ao adsorvente; simultaneamente, é verificada uma diminuição da concentração do soluto na fase líquida, ao longo do tempo. O processo é dado por concluído quando atinge o equilíbrio, isto é, quando a concentração na fase líquida atinge um valor constante [31]. Finalmente, o colóide é descartado e a fase líquida separada da fase sólida, por filtração; o adsorvente é, por fim, regenerado (normalmente por tratamento térmico) [31].

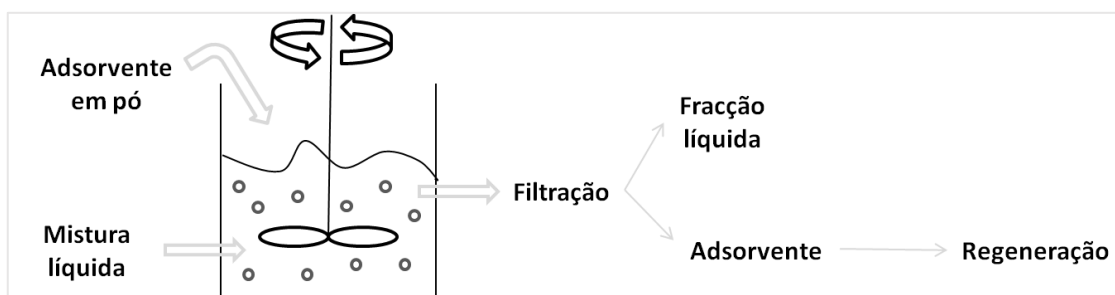


Fig. 14 – Processo de adsorção industrial, em tanque com agitação. Adaptado de [31]

A eficácia deste processo é elevada o que se deve ao constante contacto e equilíbrio estabelecido entre a mistura fluída e o adsorvente sólido [35].

3. ADSORVENTES NÃO-CONVENCIONAIS

3.1. Introdução

A adsorção consiste num processo que tem por base o equilíbrio e que se revela eficaz se for tido em conta o custo implícito, a flexibilidade e simplicidade do processo, bem como a facilidade com que o mesmo é realizado, para além de não originar substâncias perigosas [38].

Neste processo, a selecção do adsorvente a ser utilizado é um problema já que a decisão depende, não só do ciclo de adsorção, mas também da forma que o adsorvente sólido se deve encontrar (isto é, em grânulos, pó, entre outros) [35].

Idealmente, os adsorventes deveriam ser específicos, isto é, idealizados e produzidos com as características específicas para a aplicação pretendida [35]. Contudo, e independentemente do adsorvente a ser seleccionado, as características procuradas nos mesmos são comuns: capacidade, selectividade, regenerabilidade, cinética e custo associado [35].

O carvão activado representa um dos adsorventes mais populares, cuja utilização remonta desde o século dezanove; muito em parte pela grande área de superfície que apresenta e pelos seus micro e macroporos [31,35]. Adicionalmente, o carvão activado é maioritariamente apolar, resultando numa baixa afinidade com a água, o que o torna uma boa opção na separação (por adsorção) de compostos orgânicos de soluções aquosas. Por exemplo, na indústria alimentar, este adsorvente é utilizado na remoção de: proteínas, corantes, pigmentos naturais, micotoxinas, entre outros [31].

Mas, para além de ser caro, o carvão ativado é um adsorvente de difícil regeneração, o que representa algumas perdas de adsorvente; um exemplo é aquando da adsorção de fenóis já que alguns destes compostos são adsorvidos de forma irreversível [35,38].

Muitos têm sido os estudos desenvolvidos que visam a utilização de adsorventes não-convencionais, como alternativa ao carvão ativado, tornando o processo de adsorção mais barato e eficaz [35,38].

Materiais naturais, resíduos da indústria e da agricultura, bem como bioadsorventes, estão reportados como substitutos do carvão ativado por serem baratos, eficientes e facilmente disponíveis. De entre os materiais naturais, estão descritos alguns resultados promissores no que respeita à utilização de argilas [38].

O custo das argilas representa, aproximadamente, 1% a 3% do carvão ativado; então, por se tratar de um material natural e barato revelam-se de extrema importância como adsorvente alternativo [33,39].

A adsorção representa, por um lado um papel-chave mas, por outro lado, um processo limitante; isto porque futuras aplicações da adsorção estão dependentes da disponibilidade de novos (e melhores) adsorventes [35].

Neste sentido, e nos últimos 20 anos, tem sido verificado um aumento acentuado no desenvolvimento de novos adsorventes, que se revelem mais baratos e mais eficientes (entre os quais se encontram novos materiais nanoporosos). Este facto tornou a adsorção num processo-chave em várias indústrias (química, petroquímica e farmacêutica) [35,38]. Posto isto, e apesar das propriedades adsorptivas da maioria dos adsorventes continuarem pouco exploradas, não existem dúvidas acerca das vantagens que os adsorventes de baixo custo representam, ao nível comercial e do futuro [35,38].

3.2. Adsorventes não-convencionais

Os adsorventes não-convencionais, tal como reportado na literatura, apresentam grandes potencialidades por estarem rapidamente disponíveis e por serem eficientes e baratos [38]. O próprio custo dos adsorventes é um parâmetro muito utilizado para comparação entre adsorventes; assim sendo, um adsorvente pode ser considerado barato quando é abundante na natureza ou quando é um sub-produto e/ou resíduo da indústria, mas, acima de tudo, quando requer pouco processamento [38].

Mas é a natureza química do adsorvente que vai determinar qual o mais adequado, de acordo com os componentes a serem adsorvidos [31].

No caso específico da adsorção de corantes, e para que os adsorventes não-convencionais (e baratos) sejam considerados adequados têm de apresentar uma série de características específicas: elevada eficiência na remoção de uma vasta gama de corantes, elevada capacidade e taxa de adsorção e, ainda, elevada selectividade em diferentes concentrações [38].

3.3. Argilas

O conhecimento e utilização de argilas naturais pela Humanidade remonta desde os primórdios da civilização [38]. As características que apresentam continuam a ser as responsáveis pela utilização das argilas ser considerada promissora, tanto para fins de purificação, como para fins ambientais [38].

A elevada abundância de argilas em quase todos os continentes torna-as baratas, um dos requisitos para serem considerados adsorventes alternativos; além disso apresentam elevada capacidade de adsorção [38].

Estas características tão específicas tornam as argilas propícias para serem utilizadas com diferentes propósitos:

- adsorção de corantes artificiais a partir de águas resultantes da indústria têxtil [30,38] ;
- estabilização de espécies nutracêuticas na indústria farmacêutica [21] ;
- utilização enquanto sistemas de entrega de fármacos [21].

Uma das aplicações mais interessantes das argilas enquanto adsorventes recai sobre a estabilização de corantes sintéticos *flavilium* contra a radiação (fotoestabilização), conforme já descrito em zeolites e em silicatos mesoporosos [21].

O processo de adsorção de corantes propriamente dito, bem como a interação das argilas com os mesmos, são temáticas em contínuo estudo e muito poucos relatos existem sobre a intercalação/adsorção de corantes naturais (e/ou nutracêuticos) em silicatos laminares [21].

3.3.1. Definição

Facilmente encontradas por toda a superfície terrestre, as argilas são o principal componente dos solos e das rochas sedimentares. Mas a designação *argila* torna-se ambígua pois na literatura existem reportados dois termos distintos [36].

O termo utilizado na mineralogia refere-se a uma parte da família dos filossilicatos que consistem em aluminossilicates hidratados com quantidades consideráveis de magnésio, potássio, cálcio, sódio e ferro na sua constituição [36]. Apesar da constituição química variar muito, as argilas são classificadas em, apenas, oito famílias gerais: esmectites, micas, caolinas, talco, cloretos, vermiculitas, fibrosos e interestratificados [36].

Por outro lado, o termo argila pode, igualmente, se referir aos materiais naturais constituídos por grãos muito finos de minerais, que apresentam alguma plasticidade quando em contacto com a água. Este termo é aplicado a todas as partículas encontradas nos solos e/ou sedimentos, com dimensões inferiores a 2 μm , e nos quais estão incluídos os filossilicatos referidos acima [36].

Então, de uma forma muito simplificada, as argilas são grãos/partículas com uma estrutura fina e altamente porosa, constituída por uma grande variedade de filossilicatos cristalinos ricos em silício e em óxidos e hidróxidos de alumínio. Estes encontram-se hidratados, facto traduzido pela presença de água estrutural, cuja quantidade é variável. Podem, ainda, ser encontrados outros elementos como ferro e, até, outros materiais como o quartzo [30,31,36].

3.3.2. Estrutura

As argilas representam uma pequena fracção dos materiais laminares: classe especial de compostos cujos cristais são formados por aglomerações de unidades bi-dimensionais, em camadas, que se mantêm unidas por acção de forças fracas [36]. A estrutura das argilas resulta da disposição, em camadas, dos aluminossilicatos que as constituem [35,36,38].

De forma geral, a estrutura laminar das argilas pode ser comparada a uma *sandwiche* (Fig.15A): duas estruturas tetraédricas de sílica (Fig.15B, a vermelho) entre as quais se dispõe uma estrutura octaédrica de alumínio ou magnésio (Fig.15B, a azul) [36].

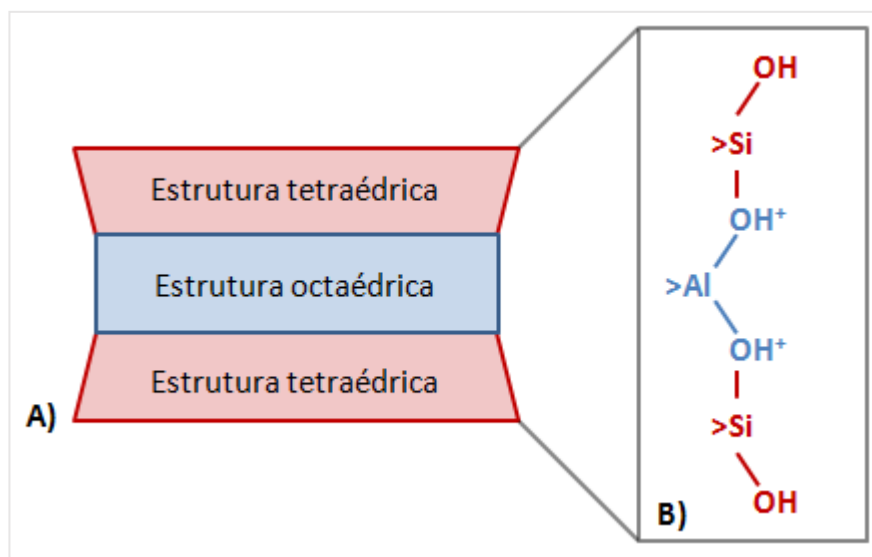


Fig. 15 - Representação esquemática da estrutura *sandwiche* de uma argila T-O-T. A) *sandwiche* do ponto de vista estrutural; B) estrutura do ponto de vista químico (vermelho a estrutura tetraédrica; azul a estrutura octaédrica). Adaptado de [36].

Na Fig.15B, a vermelho, encontra-se a estrutura tetraédrica constituída por átomos de oxigénio laterais com um átomo de sílica central. Já a estrutura octaédrica (Fig.15B,

a azul) é constituída por átomos de oxigénio e grupos OH, no centro dos quais se dispõe um átomo de alumínio (ou magnésio) [36].

Isoladamente, cada unidade (tetraédrica e/ou octaédrica) estabelece ligações com unidades iguais, ao longo do plano; daqui resultam planos atômicos sobrepostos e, consequentemente, as características lâminas das argilas (Fig.16) [36].

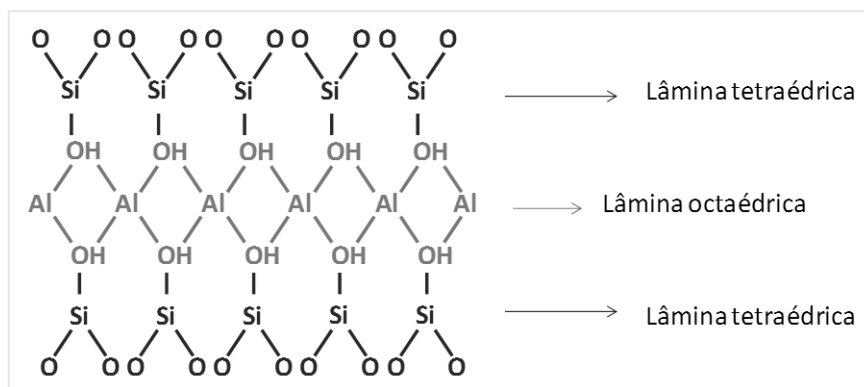


Fig. 16- Representação da estrutura laminar característica das argilas. Adaptado de [36].

A estrutura geral das argilas pode apresentar constituições químicas diferentes em cada lâmina, isto porque os catiões presentes em cada uma podem ser distintos (por exemplo, alumínio, sílica, magnésio, ferro, etc.); para além disto, as próprias lâminas podem se agrupar segundo combinações muito variadas [36]. Daqui resultam estruturas laminares com comportamentos específicos, bem como distância entre lâminas; são estas diferenças estruturais que classificam as argilas [36,38].

➤ Classificação por constituição química

Se a classificação das argilas tiver em conta a sua constituição química, as mesmas podem ser designadas de acordo com o seu conteúdo em: lâminas de silicato ($(\text{Si}_2\text{O}_5)^{-2}$), em lâminas *gibbsite* ($\text{Al}_2(\text{OH})_4$) ou em lâminas de brucite ($\text{Mg}_2(\text{OH})_4$) [36].

As lâminas de brucite (**b**) e gibbsite (**g**) organizam-se octaédricamente, enquanto as lâminas de silicatos (**s**) organizam-se tetraedricamente; é a sequência de orientação das lâminas que caracterizam e diferenciam grupos distintos de argilas: por exemplo, as esmectites são **s-g-s**, tal como as ilites (com a diferença de que as últimas apresentam um maior conteúdo de água na sua estrutura), enquanto as caulinites são **s-g**, contrariamente às lizardites que são **s-b** [36].

➤ **Classificação por constituição laminar**

Ao nível das lâminas, as argilas podem ser classificadas pelo número de lâminas tetraédricas (**T**) e lâminas octaédricas (**O**), bem como pela forma como se organizam [36]. Assim sendo, uma argila classificada como **T-O-T** diz respeito a uma argila constituída por duas lâminas tetraédricas entre as quais se dispõem uma lâmina octaédrica; por outro lado, uma argila **T-O** apresenta lâminas octaédricas e tetraédricas organizadas consecutivamente [36].

Mas a classificação de acordo com o número de lâminas é limitada uma vez que é pobre em relação aos detalhes químicos das argilas em questão [36].

➤ **Classificação de Grim**

O método mais comum de classificar as argilas baseia-se na classificação de Grim: as argilas são agrupadas de acordo com o arranjo estrutural das suas lâminas e com o tipo de estrutura das suas cadeias [36].

Então, uma argila constituída por duas lâminas tetraédricas entre as quais se encontra uma lâmina octaédrica corresponde a uma argila **s-g-s** ou **s-b-s**, que também pode ser designada de **T-O-T**, e diz respeito a uma argila laminar do tipo **2:1**. Já uma argila do tipo **s-g** ou **s-b**, também designada por **T-O**, neste tipo de classificação refere-se a uma argila **1:1** [36].

A principal diferença entre as duas classes de argilas **2:1** e **1:1** verifica-se ao nível do seu comportamento: quando colocadas em contacto com solventes polares, as argilas **2:1** têm a capacidade de se expandirem/hidratarem, contrariamente às argilas **1:1** [36].

Na Fig.17 estão representadas, simultaneamente, três formas de classificação acima referidas: constituição química (**s-g** e **s-g-s**), constituição laminar (**O-T** e **T-O-T**) e Grim (**1:1** e **2:1**).

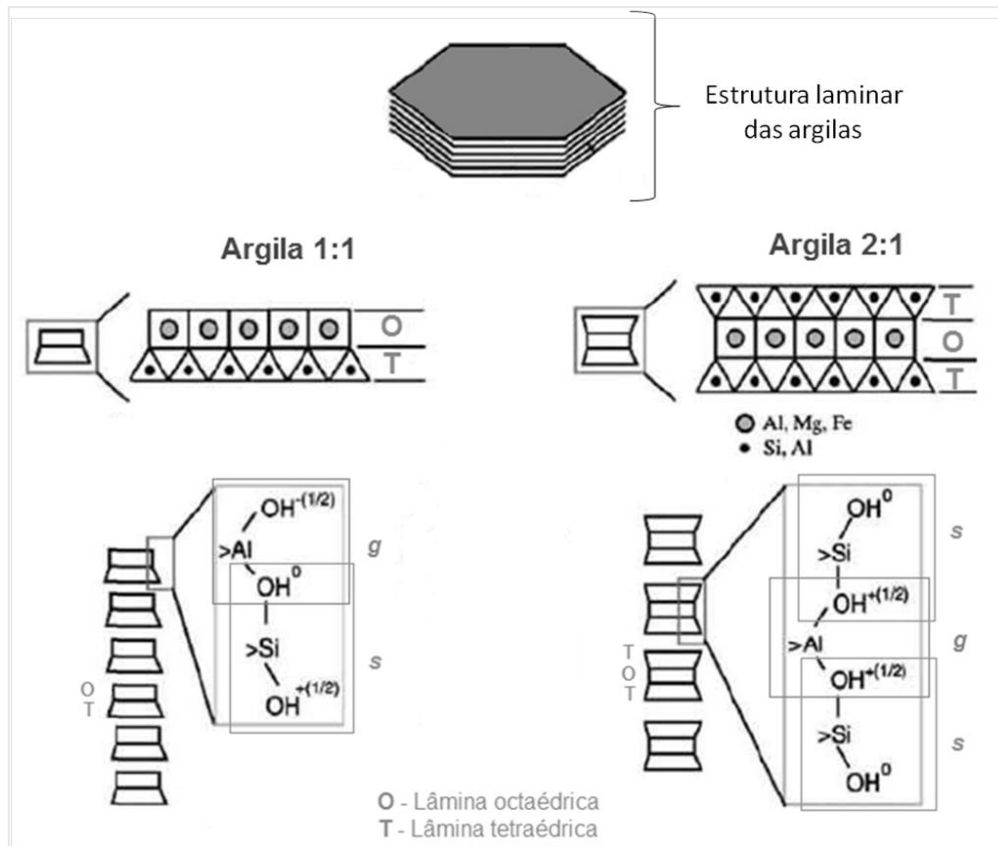


Fig. 17 - Esquemática simultânea dos três tipos de classificação das argilas. Adaptado de [36].

A fim de facilitar a classificação dos diferentes tipos de argilas existentes, são consideradas, apenas, três famílias principais de argilas: as caulinites, as esmectites-ilites (*s-g-s*) e as clorites (*s-b-s b*) [36,38].

Da família das esmectites (*s-g-s*) fazem parte dois tipos de argilas muito importantes, nomeadamente as montmorilonites (representada na Fig.18) e as saponites, ambas correspondentes a argilas do tipo **2:1**, e que serão discutidas em pormenor mais à frente [36].

O talco, apesar de pertencer à família das clorites (*s-b-s b*), é uma argila muito particular pois apresenta sequência (*s-b-s*) podendo, por isso, ser agrupada em diferentes grupos [36].

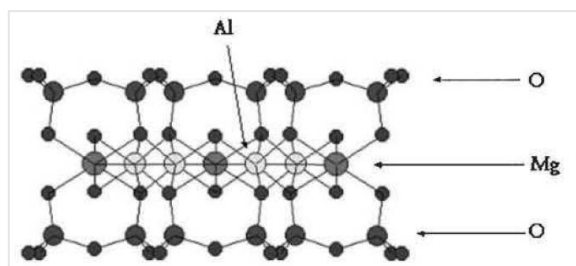


Fig. 18 – Representação esquemática de uma argila montmorilonite [36].

As diferenças estruturais das argilas resultam em diferenças morfológicas; as esmectites, por exemplo, apresentam-se como partículas planares pouco diferenciadas, irregulares, com tamanho inferior a 2 microns [36].

Na Fig.19 estão representadas as estruturas das esmectites e do talco (A e B, respectivamente), cujas diferenças químicas originam morfologias bastante distintas (C e D, respectivamente) [36].

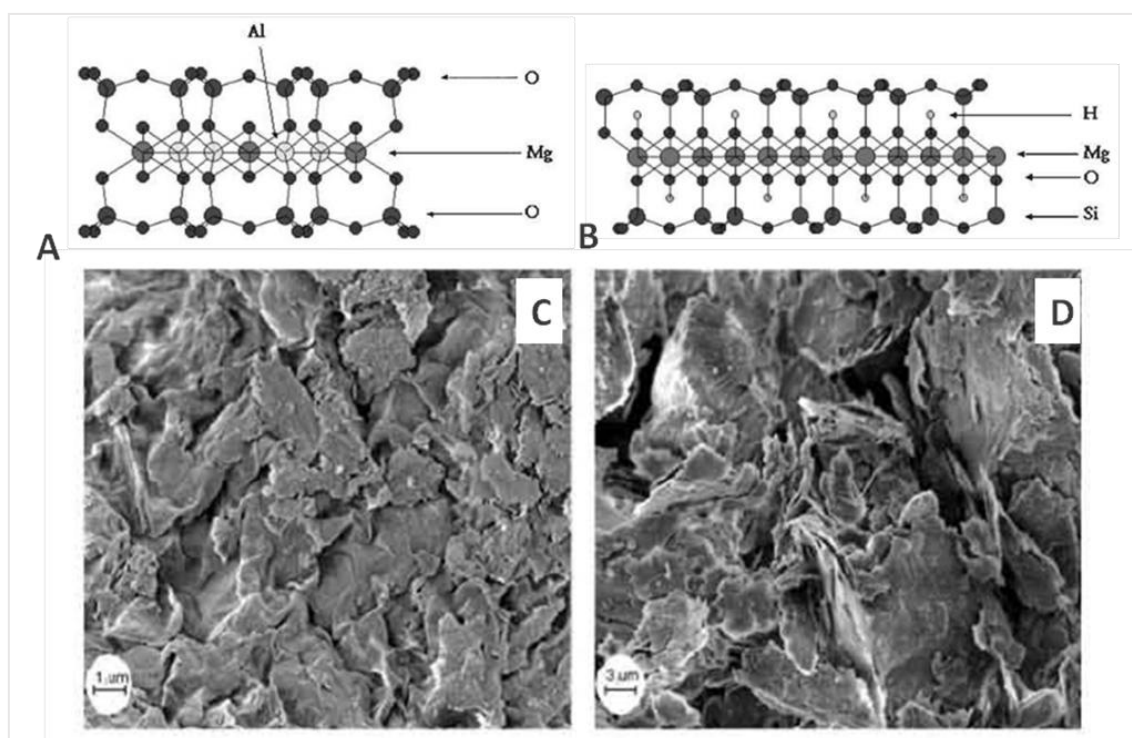


Fig. 19 – Representação estrutural de argilas e respectivas morfologias (obtidas por microscopia electrónica de varrimento): A- representação estrutural de uma esmectite; B- representação estrutural do talco; C- morfologia de uma esmectite; D- morfologia do talco. Adaptado de [36].

Mas as diferenças estruturais verificadas entre as argilas não se reflectem apenas em diferenças morfológicas; também o comportamento e algumas características são o resultado da estrutura [33,36,38].

A capacidade de adsorção, por exemplo, deve-se, em muito, à carga de superfície negativa que as argilas apresentam (resultante da sua estrutura), e que as torna capazes de adsorver moléculas com carga positiva, tais como antocianinas. Também a área de superfície das argilas, bem como a porosidade que apresentam (que chega a atingir cerca de 50% do seu volume) estão envolvidas na capacidade de adsorção (numa relação de proporcionalidade directa [33,38].

3.3.3. Classificação

3.3.3.1. Esmedites (Montmorilonites e Saponites)

As argilas montmorilonites e saponites, ambas classificadas como esmedites, são as argilas mais estudadas para fins de intercalação de fármacos; apresentam elevada capacidade de troca iónica e de expansão em meio aquoso [21,37]. As esmedites representam um dos três grupos mais importantes da família dos materiais laminares com estrutura 2:1 [36].

A estrutura 2:1 das esmedites corresponde, especificamente, a: uma lâmina de alumínio (octaedros de átomos de alumínio ligados a átomos de oxigénio e a grupos hidroxilo (Fig.20A, capazes de se polimerizar bi-dimensionalmente, Fig.20B) que é envolvida por duas lâminas de sílica (estrutura de átomos de silício ligados a átomos de oxigénio – SiO_4 -numa estrutura tetraédrica (Fig.21A), que se polimeriza bi-dimensionalmente, Fig.21B) [35,36].

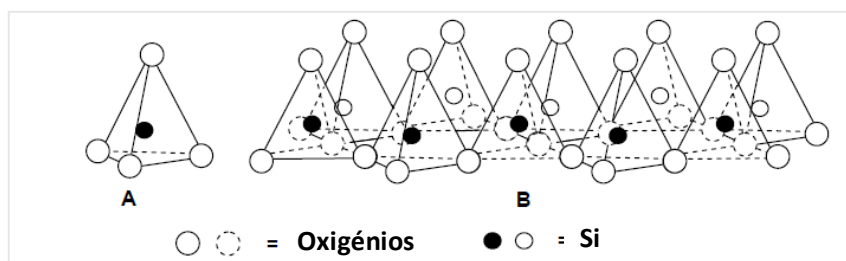


Fig. 20 - Representação esquemática de: A- unidade tetraédrica individual; B- lâmina de unidades tetraédricas. Adaptade de [37].

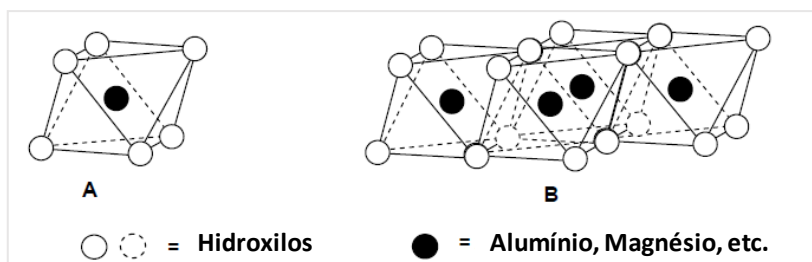


Fig. 21 – Representação esquemática de: A- unidade octaédrica individual; B- lâmina de unidades octaédricas. Adaptado de [37].

O número e tipo de cátions presentes na lâmina octaédrica é um critério que classifica as esmectites (em dioctaédricas ou em trioctaédricas, sendo as argilas montmorilonites classificadas como dioctaédricas [36]:

- Dioctaédricas – 2 octaedros ocupados por cátions trivalentes (ex: Al^{3+});
- Trioctaédricas – 3 octaedros ocupados por cátions divalentes (ex: Mg^{2+}).

A estrutura destas argilas é formada por lâminas negativas (2:1) empilhadas, intercaladas com cátions hidratados de forma a equilibrar a carga (Fig.22). É a este equilíbrio de carga que se deve a elevada capacidade de troca iónica (CEC) característica destas argilas; esta propriedade mede a quantidade total de cátions adsorvidos na argila e é expressa em miliequivalentes por 100 gramas de argila seca (meq/100 g) [21,36].

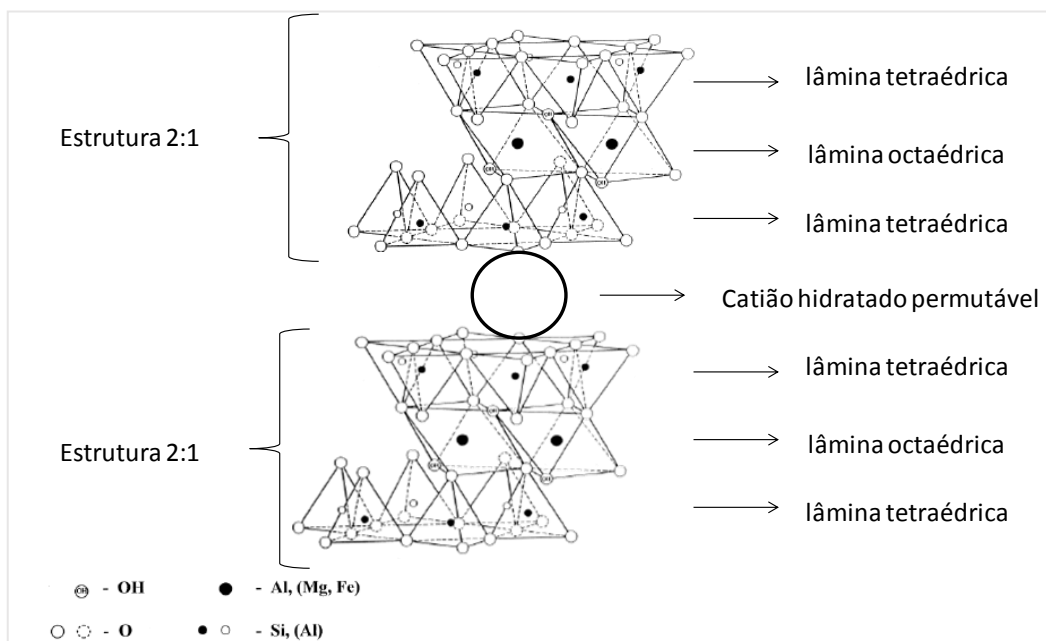


Fig. 22 - Representação esquemática da estrutura de uma argila esmectite. Adaptado de [37].

As argilas montmorilonites, por exemplo, apresentam valores de CEC a rondar os 81-124 meq/100 g. Uma das características destas argilas é os valores de CEC serem altamente variáveis e estão relacionados com a sua composição, que por sua vez é o resultado das diferenças verificadas ao nível da sua génese/origem [36].

Dependendo do catião permutável dominante, as argilas podem ser denominadas por sódicas (Na^+) ou cálcicas (Ca^{2+}), sendo que as montmorilonites sódicas e cálcicas são as mais comuns no grupo das esmectites [36].

As montmorilonites sódicas caracterizam-se pela distribuição das cargas de superfície não ser homogénea: enquanto a superfície interna apresenta carga negativa resultante da troca/substituição dos iões internos (trocas isomórficas) e, por isso, independente da composição aquosa, por outro lado a carga da superfície externa é dependente do pH do meio e é originada por reacções de adsorção/dessorção de protões nos grupos OH localizados à superfície [36]

Uma característica importante das esmectites, é a elevada capacidade que apresentam para doar electrões, o que aumenta a capacidade de adsorção [36].

Outra importante característica destas argilas é a capacidade de expansão/hidratação que está directamente relacionada com a energia de hidratação dos catiões intercalados; daqui resulta que o espaçamento basal nas esmectites não é constante, dependendo do tipo catiões intercalados e do estado de hidratação. Dependendo do número de camadas de hidratação, o espaçamento basal de uma esmectite pode aumentar até mais de 90% do valor inicial [36,37].

SWy-2

A argila SWy-2 é classificada como uma montmorilonite sódica (Na^+), é encontrada no estado do Wyoming (E.U.A), mais precisamente em County of Crook, na formação Newcastle (é uma argila com génese a partir de crustáceos) [40]. As características principais desta argila estão descritas pelo fornecedor [40].

SapCa-2

A argila SapCa-2 é classificada como saponite e é encontrada em Ballarat, no estado da Califórnia (E.U.A) [40]. As características principais desta argila estão descritas pelo fornecedor [40].

A carga negativa das lâminas é a principal característica que diferencia estas duas argilas. Enquanto na SWy-2 a carga negativa advém, principalmente, da substituição de Mg^{2+} por Al^{3+} na lâmina octaédrica, na argila SapCa-2 a carga negativa resulta da substituição do Al^{3+} por Si^{IV} nas lâminas tetraédricas [21].

Esta diferença de origem de cargas influencia a capacidade de adsorção de cada uma das argilas, que por sua vez está relacionada com a capacidade de expansão/hidratação de cada uma [21].

A capacidade de expansão/hidratação das argilas esmectites pode ser condicionada pela presença de cargas tetraédricas, em relação às cargas octaédricas: enquanto as cargas tetraédricas estão mais próximas do espaço entre as lâminas, as cargas octaédricas estão mais distantes. Assim, as cargas octaédricas originam interações fracas na superfície basal, resultando em maior capacidade de expansão, enquanto as tetraédricas podem criar potenciais electrostáticos periódicos nas superfícies basal e, portanto, menor capacidade de expansão [21].

Apesar da área de superfície total da SapCa-2 ($780 \text{ m}^2/\text{g}$) ser ligeiramente maior do que a da SWy-2 ($724 \text{ m}^2/\text{g}$), a cinética de adsorção de pigmentos nesta argila é desfavorecida pois apresenta menor capacidade de adsorção, relativamente à SWy-2 [21].

3.3.3.2. Bentonite

As argilas bentonites são filossilicatos de alumínio, maioritariamente constituídas por montmorilonites e, na maioria dos casos são argilas impuras [31].

Tal como nas montmorilonites, é o catião hidratado permutável maioritário o responsável pelas propriedades tão distintas que estas argilas apresentam; nas argilas bentonite o catião maioritário é o sódio (Na^+) [31].

O interesse pelas bentonites tem vindo a crescer nos últimos anos, devido à propriedade que apresentam de adsorver, tanto moléculas inorgânicas, como moléculas orgânicas. A interacção entre corantes e este tipo de argilas tem sido alvo de muitos estudos, onde relatam, por exemplo, a maior capacidade desta argila adsorver corantes básicos – não só pela sua carga iónica, como também pelo carácter da própria argila [38].

Adicionalmente, as bentonites apresentam uma propriedade interessante: adsorvem quantidades relativamente grandes de proteínas, a partir de soluções aquosas [31].

NaSDN₃

A argila NaSDN₃ é caracterizada como uma bentonite, recolhida na Serra de Dentro, Ilha do Porto Santo (arquipélago da Madeira), cujos depósitos estão localizados, maioritariamente, na zona oriental da ilha e segundo Fernandes [37], são únicos no território português.

A formação dos depósitos desta argila pode ter por base alterações de tufos vulcânicos, neutros e/ou ácidos, ricos em vidro [37].

A argila NaSDN₃ corresponde a uma bentonite trocada com sódio (Na⁺) [37].

3.3.3.3. Talco

Vulgarmente conhecido como pó talco, e muito utilizado em diversas indústrias, o talco corresponde a um mineral natural classificado como um filossilicato 1:1. Apesar de, idealmente, a sua fórmula química ser Mg₃(OH)₂Si₄O₁₀ (estrutura representada na Fig.23) na realidade o talco pode apresentar outros minerais associados, cujas quantidades podem variar, desde vestigiais a consideráveis, dependendo da sua origem e método de preparação [36,41,42].

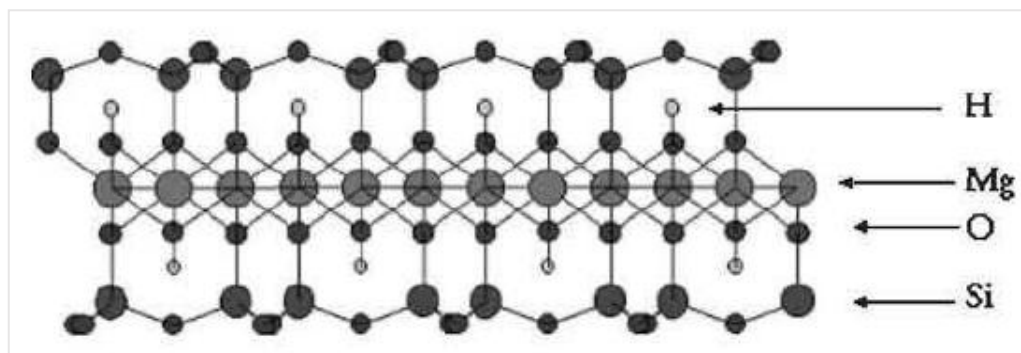


Fig. 23- Representação esquemática da estrutura do talco [36].

Esta particular classe de argila é comercializada sob a forma de pó fino, resultado da pulverização que os agregados granulares ou laminares originais sofrem. As suas partículas (Fig.24) são relativamente grandes, individualizadas e com limites bem visíveis, tornando a sua textura impalpável e untuosa [36,41].

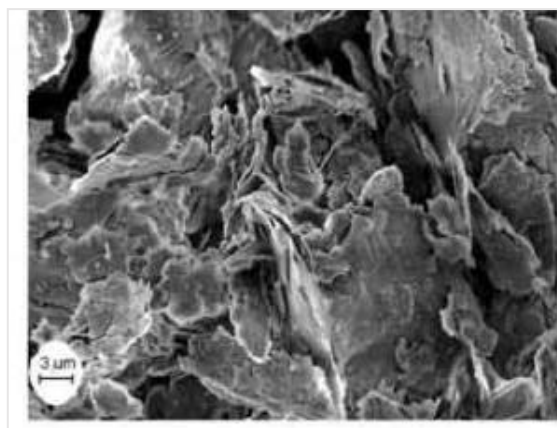


Fig. 24 – Morfologia das partículas talco (obtida por microscopia electrónica de varrimento) [36].

Quanto à cor do talco, varia de acordo com o grau de pureza que apresenta, sendo que o talco puro é branco; posto isto, o talco a ser utilizado deve se assemelhar, o máximo possível, ao branco. Daí que a própria cor do talco pode ser utilizado como um indicador indirecto de qualidade e pureza já que a presença de outros elementos (ferro, cobre, níquel ou cobalto) ou impurezas na sua estrutura resultam em variações da sua cor [36,41].

O talco representa uma classe especial de argilas, e a sua utilização é muito comum na indústria da cosmética e na indústria farmacêutica e ainda noutras indústrias mais gerais [36,41,42].

É comum serem verificadas diferenças ao nível do conteúdo de mineral talco (e consequentemente da pureza) de acordo com a indústria na qual é utilizado: o talco industrial representa o talco menos puro (com teor de talco inferior a 30%), já o talco cosmético apresenta, pelo menos 85% - 90% de talco e, por sua vez, o talco farmacêutico apresenta uma pureza superior ao cosmético (por imposição das farmacopeias que regulam a qualidade de todos os materiais utilizados na indústria farmacêutica) [41,42].

A utilização do talco nas indústrias acima referidas é o reflexo das suas características, que o tornam apetecível: do ponto de vista químico, o talco é altamente inerte e, portanto, estável; a isto se aliam as vantagens de ser suave e escorregadio ao tacto. Ficam assim reunidas as condições ideais para a sua utilização na indústria farmacêutica como agente lubrificante e de enchimento, para o fabrico de comprimidos e ainda como estabilizador de suspensões, e na indústria cosmética em produtos dermatológicos para aplicação externa [41,42].

Como referido anteriormente, a estrutura das argilas influencia directamente o comportamento e as características das mesmas. Uma das características do talco é o seu elevado carácter hidrofóbico, quando colocado em contacto com a água, resultado da sua baixa tendência para doar electrões; isto indica que os oxigénios presentes à sua superfície não partilham com facilidade o único par de electrões [36].

Outra importante característica do talco com influência directa no comportamento é o facto de apresentar carga de superfície baixa (quase nula), que se manifesta na incapacidade do talco expandir em meio aquoso, contrariamente à maioria das argilas (do tipo 2:1) [36].

3.3.4. Propriedades electrocinéticas das argilas

As argilas apresentam diversas propriedades únicas que originaram um campo de investigação imenso e complexo [36].

O comportamento das argilas, quer no que diz respeito à sua superfície, quer no que concerne ao mecanismo de interacção em sistemas aquosos, é justificado segundo as suas propriedades electrocinéticas; estas dependem da composição química da argila e do arranjo estrutural das lâminas (tetraédricas e octaédricas) [36].

➤ Carga de superfície

A carga de superfície é uma das características importantes das argilas pois dita o comportamento destes materiais inorgânicos quando colocadas em meio aquoso (comportamentos de dispersão ou agregação). É ainda este atributo que define a possibilidade das argilas formarem uma suspensão aquosa estável [36].

A carga de superfície das argilas resulta do arranjo estrutural das lâminas tetraédricas e octaédricas que as constituem (bem como as combinações das lâminas) [36].

As argilas esmectites, por exemplo, apresentam uma elevada carga de superfície. Isto resulta em repulsão electrónica nos átomos de oxigénio que, em vez de doarem o seu par de electrões para formar pontes de hidrogénio à superfície externa, desviam-no para a superfície interna, podendo assim interagir, não só com a água mas também com moléculas orgânicas [36]. A carga de superfície deste tipo de argila é aumentada na presença de catiões monovalentes ($\text{Li} > \text{K} > \text{Na}$), para além de que a superfície interna deste tipo de argilas apresenta uma maior afinidade para catiões orgânicos, comparativamente aos catiões inorgânicos [36].

➤ **Área de superfície**

A área de superfície é outra das propriedades vantajosas das argilas que lhes permite serem utilizadas nas indústrias farmacêutica e cosmética [21].

Na maioria dos casos, e independentemente da sua natureza sintética ou natural, as argilas apresentam elevadas áreas de superfície que resultam do arranjo estrutural característico que apresentam (em lâminas) [36].

A área de superfície de um sólido aumenta (em volume) à medida que este é fraccionado; a área de superfície de uma argila é influenciada por dois aspectos, nomeadamente o tamanho dos grãos (em proporcionalidade inversa) e a porosidade da mesma (numa proporcionalidade directa) [36].

É possível definir, especificamente, uma área de superfície, já que existem vários métodos disponíveis para tal. A forma mais conveniente de expressar a área de superfície de uma argila é através da expressão do seu valor em área de superfície por unidade de massa. O método mais comum de definir a área de superfície de uma argila é o método BET que se baseia na quantificação de um gás adsorvido numa determinada e conhecida massa de sólido; o parâmetro chave deste método baseia-se na medição da área média de adsorvente ocupada por uma molécula de adsorbato quando é formada uma monocamada [36].

Esta quantificação é apresentada sob a forma de um gráfico – isoterma de adsorção – que representa o volume adsorvido em relação à pressão relativa. O instrumento BET converte, de forma automática, a capacidade da molécula adsorvida (em monocamada) numa área de superfície, que é expressa em m^2/g [32].

De acordo com valores reportados na literatura, a área de superfície das argilas pode variar de $< 1 \text{ m}^2/\text{g}$ (quando se tratam de caolinas, cujos grãos são grandes e bem cristalizados, sendo este um valor considerado baixo) até $700 \text{ m}^2/\text{g}$ (no caso de uma montmorilonite parcialmente laminada); como valores de referência temos a área de superfície do carvão activado de $1000 \text{ m}^2/\text{g}$ [36].

➤ **Capacidade de adsorção**

A capacidade de adsorção é outra das propriedades vantajosas das argilas e está directa e proporcionalmente relacionada com área de superfície [21,32]. Mas a capacidade de adsorção de um adsorvente – e, conseqüentemente, a quantidade de

adsorbato que é capaz de adsorver - também está relacionada com a porosidade do mesmo, que por sua vez se relaciona com a área de superfície [32,36].

Para uma total percepção do processo de adsorção num determinado adsorvente, é fundamental ter conhecimentos acerca da área de superfície bem como da porosidade do adsorvente em questão [32].

A capacidade de adsorção de um adsorvente também pode ser determinada pela medição do ângulo de contacto (θ) que o líquido estabelece à superfície do adsorvente. Como regra geral temos que:

- $\theta > 90^\circ$ - **material hidrofóbico** (o líquido tende a formar gotas à superfície do adsorvente (Fig.25A));
- $\theta < 90^\circ$ - **material hidrofílico** (o líquido tende a se espalhar ao longo da superfície do adsorvente (Fig.25B);
- $\theta \approx 90^\circ$ (Fig.25C) – **material semi-hidrofílico** (o líquido forma um filme/barreira muito fino à superfície do adsorvente [32].

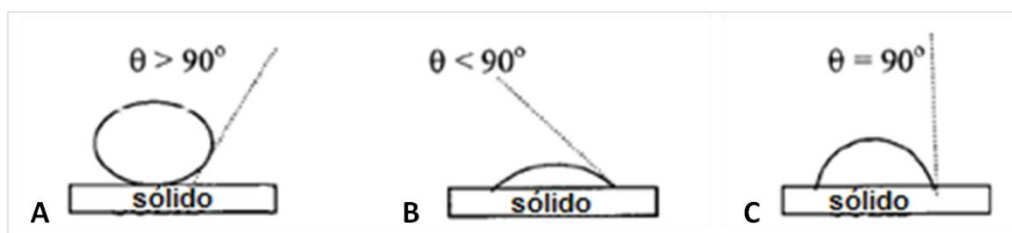


Fig. 25 - Representação dos ângulos de contacto entre um líquido e um sólido; A- material hidrofóbico; B- material hidrofílico; C- material semi-hidrofílico. Adaptado de: [36].

A natureza hidrofílica das argilas indicam a tendência que estas apresentam para se manter em suspensão [36].

Ao longo do tempo, podem ser verificados dois tipos de ângulo de contacto: um inicial (que corresponde ao primeiro contacto entre o líquido pretendido e o adsorvente seco) e outro considerado de equilíbrio (condição de equilíbrio verificada entre o líquido e a superfície do material) [32].

Atavés de tratamentos químicos, é possível melhorar/aumentar a capacidade de adsorção das argilas. De entre os tratamentos possíveis, destacam-se o tratamento térmico e a activação ácida das argilas: está reportado que o tratamento térmico aumenta a capacidade de adsorção das argilas em, cerca de 16%; também foi comprovado que as

bentonites tratadas com ácidos apresentam uma maior capacidade de adsorção comparativamente às não tratadas, por aumento da área de superfície [30,35,38]

➤ **Capacidade de expansão/hidratação**

Na maioria das aplicações industriais as argilas são utilizadas já molhadas ou são previamente colocadas em contacto com a água [36]; em ambos os casos as argilas podem sofrer uma grande variedade de efeitos químicos, daí que as interações argila-água representam um campo de estudos muito vasto, pois uma única estrutura geral é capaz de originar muitos comportamentos [36].

Qualquer partícula mineral, quando em contacto com um líquido, apresenta uma carga electrocinética intrínseca dependente de algumas propriedades da fase líquida (tais como pH e força iónica) [36]. As argilas não são excepção e apresentam carga à superfície; é, aliás, esta carga de superfície que as torna capazes de alguns mecanismos específicos, entre os quais a capacidade de expansão [36].

A expansão das argilas traduz o fenómeno destas formarem uma dispersão coloidal (devido ao reduzido tamanho das suas partículas), quando em contacto com água; dá-se um aumento do seu volume inicial, por captação de água para o espaço interlaminar da argila, que se reflecte num aumento do espaçamento basal (d_{001}) da argila. [30,33,36]

Uma vez que a maioria das argilas são hidrofílicas ($\theta < 90^\circ$), com ângulos de contacto que variam entre 30° e 40° (Fig. 26) – e à excepção do talco que é uma argila com carácter hidrofóbico - o fenómeno de expansão das argilas pode ser, igualmente, descrito como um fenómeno de hidratação [36].

O fenómeno de expansão/hidratação das argilas está representado, de forma simplificada, na Fig.27.

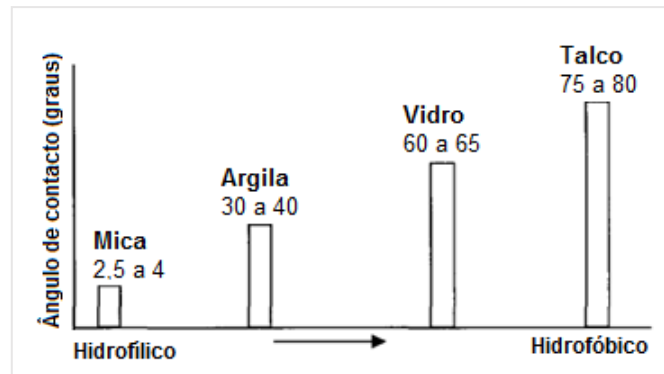


Fig. 26 – Esquema ilustrativo da hidrofiliicidade das argilas: (a) ângulos de contacto resultantes da interacção do líquido com a superfície do sólido; (b) gráfico representativo dos ângulos de contacto comuns de alguns sólidos. Adaptado de [36].

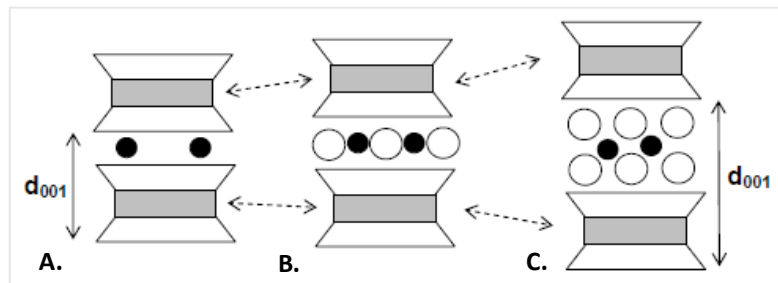


Fig. 27 – Representação esquemática do processo de expansão/hidratação de uma argila (montmorilonite); A- argila desidratada/seca; B- argila hidratada (camada única de moléculas de água); C- argila hidratada (dupla camada de moléculas de água). Adaptado de: [37]

Durante o processo de expansão/hidratação é verificado um aumento da viscosidade da argila; a área de superfície da argila pode aumentar em mais de 200% e também o volume da mesma é alterado para cerca de 0,95 nm acima do valor normal, resultado da quebra das ligações fracas que mantêm as lâminas das argilas coesas [36,43].

Nem todas as argilas apresentam a capacidade de expandir/hidratar quando em contacto com água/líquidos polares. Este fenómeno é característico das argilas do tipo 2:1 (tais como esmectites) - contrariamente às argilas do tipo 1:1 (por exemplo, o talco) – que as torna sistemas altamente estruturados; é exatamente esta propriedade que caracteriza as argilas do tipo esmectites, nas quais se incluem as montmorilonites [36].

O próprio processo de adsorção de espécies catiónicas é considerado um passo da expansão da argila pois as espécies catiónicas adsorvidas no espaço interlaminar da argila fazem aumentar o volume da mesma [36].

Mas a compreensão total deste fenómeno tão característico apenas é possível quando são estudadas as alterações termodinâmicas que ocorrem durante o processo de expansão/hidratação [36].

3.3.5. Aplicações das argilas

As argilas apresentam características únicas no que diz respeito ao tamanho das suas partículas e à estrutura cristalina o que as torna adequadas em diversas aplicações industriais (tais como agentes adsorventes, anti-inflamatórios, entre outras) [36].

Por serem facilmente encontradas à superfície terrestre e pelas propriedades particulares que apresentam, as argilas são utilizadas desde a pré-história para propósitos terapêuticos; actualmente, esta continua a ser uma das principais aplicações das argilas (apesar de mais restrita por imposições regulamentares específicas) [36].

O desenvolvimento de várias áreas da ciência – mineralogia, química e farmácia – foi fundamental para perceber a natureza destes materiais naturais; mas foi o desenvolvimento de técnicas como a difracção de raios-X (XRD), no início do séc XX, que permitiu perceber os motivos das suas propriedades únicas [36].

Conforme revisto na literatura, as argilas têm diversas aplicações a nível industrial. Na tabela 3 estão resumidas algumas dessas aplicações.

Tabela 3 - Aplicações industriais das argilas. Informação disponível em [36].

Aplicações farmacêuticas	Excipiente	Facilitar a administração de um princípio-activo; melhorar estabilidade ou aspecto final.	Aplicações tópicas (para manter a dose de princípio activo na área a ser tratada, por aumento da viscosidade)
	Princípio activo	Tratamento activo de doenças	Protectores gastro intestinais; anti-ácidos; anti-inflamatórios
	Transporte de fármacos	Interacção com o princípio activo do medicamento	Melhorar a biodisponibilidade;
Cosmética	Terapêuticas de SPA's	Tratamento de patologias reumáticas e artríticas	Utilizado pelas propriedades de absorção e arrefecimento lento

3.4. Resinas

Para além das argilas (adsorventes minerais), também as resinas poliméricas (adsorventes sintéticos) têm sido aplicadas com sucesso na recuperação/separação selectiva de compostos bioactivos [31,34].

As resinas macroporosas surgem então como técnica eficiente de separação, recuperação e concentração de compostos bioactivos, a partir de diversas fontes, resultado das suas particulares características físicas. Do ponto de vista comercial, são utilizadas, por exemplo, na purificação e fracionamento de compostos polifenólicos; são também utilizadas no tratamento de águas [5,34,35].

Outra área de aplicação das resinas é a indústria farmacêutica, na qual são utilizadas na purificação de antibióticos, vitaminas, aminoácidos e péptidos. Estas aplicações apenas são possíveis porque a utilização das resinas macroporosas sintéticas está regulamentada: de acordo com os requisitos do código de regulação da EFDA

(*European Food and Drug Administration*) são aceites e aprovadas para contacto com a comida [5,35].

Uma importante aplicação das resinas macroporosas enquanto adsorventes é na remoção e recuperação de compostos fenólicos de produtos e sub-produtos alimentares resultantes do processamento de plantas [5,26].

Por exemplo, são utilizadas na purificação de antocianinas ou na sua concentração a partir de extratos diluídos. Estudos baseados na utilização de nove resinas diferentes para a adsorção de antocianinas obtidas a partir de *roselle* (*Hibiscus sabdariffa* L.), indicaram que tanto resinas polares como resinas apolares são viáveis para a adsorção destes compostos naturais (pois estes contêm na sua estrutura, tanto grupos fenilalil apolares como grupos multihidroxi polares) [5,26].

Existe uma grande variedade de resinas poliméricas, bem como derivados destas, que podem ser utilizadas como adsorventes; cada uma apresenta propriedades únicas que as torna interessantes e, por isso, são alvo de investigação contínua [35].

3.4.1. Composição química e estrutura

Os polímeros macroporosos, dos quais são exemplo as resinas, também são referidos como polímeros macroreticulares e resultam de uma tecnologia que é capaz de desenhar e sintetizar porosidade em polímeros [35].

Apesar de existirem resinas de acrilatos e metacrilato (ligeiramente hidrofílicas), a maior parte das resinas comercialmente disponíveis são de poliestireno reticulado: sintetizado por adição de 0,5-25 % de divinilbenzeno (DVB) a estireno, num processo de polimerização que origina resinas com carácter apolar/hidrofóbico e completamente ionizadas a qualquer valor de pH [5,31,35].

As características principais das resinas poliméricas são: baixo custo, grande capacidade de adsorção e dessorção (directamente dependente do tamanho dos poros da resina em questão) e fácil regeneração [5,31].

As resinas poliméricas são comercializadas na forma de esferas; cada esfera consiste na aglomeração de uma grande quantidade de microesferas que, por sua vez, são aglomerados de partículas de microgel, cujo tamanho varia entre 0,01 e 15 μm [35].

Estes adsorventes apresentam uma estrutura altamente porosa, resultado da estrutura dos seus próprios poros: constituídos por mesoporos (entre as microesferas) e macroporos (nas próprias microesferas). Os macroporos dependem da quantidade de DVB e, consequentemente, do grau de reticulação [31,35].

É a esta característica que se deve a grande área de superfície das resinas, bem como rigidez e força mecânica; adicionalmente, a maior parte das resinas apresentam um grau de reticulação de 5-20 % [35].

3.4.2. Propriedades físico-químicas e de operação

Muitas são as características que tornam a utilização das resinas poliméricas vantajosa: são resistentes, eficientes, selectivas, baratas e podem ser sintetizadas com as características específicas para a utilização pretendida. Para além disto, do ponto de vista químico, são estáveis e inertes, e apresentam uma grande capacidade de adsorção, permitindo que adsorvam e desorvam vários compostos orgânicos, de acordo com o meio onde se encontram [31,34,35].

De uma forma geral o processo de adsorção apresenta uma relação linear com a área de superfície e com o raio do poro do adsorvente; no caso das resinas, os poros cilíndricos e esféricos aumentam a capacidade de adsorção já que permitem que sejam estabelecidas mais interações entre o adsorbato e os átomos da superfície [5,26,35].

No processo de adsorção em resinas, estão envolvidas interações do tipo *van der Waals* ou pontes de hidrogénio; o rendimento do processo é, assim, fortemente afectado pela estrutura química e pela funcionalização da superfície da resina. Entende-se por funcionalização da superfície o processo de adição de grupos funcionais à estrutura da resina; daqui resulta um processo de adsorção mais selectivo e eficiente [26,34].

As resinas apresentam uma maior capacidade de adsorção quando são colocadas em contacto com concentrações mais elevadas de soluto (especialmente quando se tratam de moléculas orgânicas de grandes dimensões). Outros parâmetros que possam influenciar o processo de adsorção - nomeadamente pH e temperatura - não têm influência sobre este tipo de adsorvente [34,35].

É a constituição química da resina e a sua estrutura que origina outra das características importantes das resinas poliméricas: grande parte da superfície é constituída por anéis de benzeno o que as torna altamente aromáticas; por isto as resinas revelam um carácter altamente hidrofóbico (e, consequentemente, excelentes adsorventes de compostos orgânicos em meio aquoso, principalmente os compostos pouco solúveis) [35].

Mas a principal vantagem das resinas é a facilidade com que podem ser regeneradas: pela simples adição de solventes apolares, de soluções aquosas ácidas ou básicas ou, ainda, pela adição de soluções salinas [35].

3.4.3. Lewatit VP OC 1064 MD PH

Uma das resinas sintéticas comercializadas é a Lewatit VP OC 1064 MD PH. Trata-se de uma resina macroporosa, vendida sob a forma de esferas de poliestireno, individuais e porosas, com tamanho uniforme e aparência branca e opaca [44].

É uma resina não funcionalizada, isto é, sem grupos funcionais na sua superfície; é, então, adequada para utilização na adsorção/remoção de moléculas orgânicas apolares, bem como na extração de produtos orgânicos naturais ou sintéticos (quer na indústria química, quer na indústria farmacêutica) [44].

As propriedades desta resina tornam-na bastante estável, química e mecanicamente, apresentando baixo atrito e um ótimo rendimento no processo de adsorção [44].

Na tabela 4 estão resumidas as principais propriedades desta resina, bem como as condições de operação recomendadas pelo fabricante [44].

Tabela 4 - Propriedades físicas, químicas e de operação da resina Lewatit VP OC 1064 MD PH. Adaptado de [44].

Tamanho médio das esferas	0,44-0,54 mm
Densidade	1,02 g/mL
Teor de retenção de água	50-60 %
Área de superfície (BET)	800 m ² /g , aprox.
Volume de poros	1,2 cm ³ /g
Diâmetro do poro (em média)	5 - 10 nm 50 – 100 Å
Estabilidade na escala de pH	0-14
Estabilidade à temperatura	-20 – 120 °C
Temperatura de armazenamento	-20 – 40 °C
Temperatura máxima de operação	120 °C
pH-ótimo de operação	1 - 14

Esta resina é facilmente regenerada por utilização de solventes orgânicos, tais como metanol, sendo que alguns adsorbatos podem ser dessorvidos por utilização de hidróxido de sódio (NaOH) ou de ácido clorídrico (HCl) [44].

3.5. Aplicação industrial dos adsorventes não-convencionais

Muitos são os estudos publicados que utilizam adsorventes não-convencionais; mas estes são aplicados à escala laboratorial. A aplicação dos adsorventes não-convencionais à escala industrial constitui uma dificuldade por vários motivos [38]:

- as características dos materiais são muito variáveis;
- possíveis dificuldades ao nível da disponibilidade do recurso podem resultar na perda de interesse por parte das indústrias;
- a eficácia do processo de adsorção está dependente do material utilizado, pois cada um tem as suas vantagens e desvantagens, tornando o processo muito específico.

O processo de adsorção pode constituir uma tecnologia interessante do ponto de vista ambiental, principalmente quando os adsorventes utilizados são de baixo custo. Mas isto só seria realidade se os adsorventes já se encontrassem em condições de utilização imediata; a problemática são os processos químicos e físicos aos quais a maioria dos adsorventes de baixo custo têm de ser submetidos de forma a aumentar a capacidade de adsorção e a selectividade [38].

II. Parte Experimental, resultados, discussão e conclusões

1. Extracção de antocianinas e optimização dos parâmetros de adsorção

1.1. Objectivo

O primeiro objectivo desta etapa experimental do trabalho foi a obtenção da matéria-prima para o estudo. Na impossibilidade de se obter antocianinas puras em quantidades adequadas, e como ponto de partida do trabalho, procedeu-se à extracção de antocianinas a partir de fontes naturais.

O segundo objectivo consistiu em otimizar alguns dos parâmetros envolvidos no processo de adsorção, de forma a favorecer e maximizar a imobilização das antocianinas nos adsorventes.

O objectivo final foi otimizar o tempo de adsorção necessário para cada adsorvente. Simultaneamente, estudou-se o comportamento dos adsorventes no processo de adsorção: ao longo do tempo e já nas condições experimentais anteriormente optimizadas.

1.2. Metodologia

1.2.1. Antocianinas

Seleção, recolha e preparação das amostras

Foram seleccionadas como fontes de antocianinas: bagas de faia (*Myrica faya*), amoras (*Rubus grandifolius*) e mirtilos - vulgarmente conhecidas como uveiras - dos Açores (*Vaccinium cylindraceum*) e da Madeira (*Vaccinium padifolium*).

As amostras foram recolhidas em habitat natural, dando preferência às bagas mais maduras (mais escuras) e cujas características físicas indicassem não contaminação nem degradação.

Na tabela 5 encontram-se as informações de recolha referentes a cada amostra, nomeadamente local e data de recolha.

Tabela 5 - Informações de recolha das amostras.

Amostra	Local de recolha	Data de recolha
Faia	Machico	Julho 2013
Amora	Funchal	Outubro 2014
Uveira dos Açores	Ilha Terceira (Açores)	2014
Uveira da Madeira	Funchal	Outubro 2014

As amostras foram lavadas, congeladas a uma temperatura de -80°C e posteriormente liofilizadas. Uma vez liofilizadas, as amostras foram moídas e armazenadas a -20°C até à sua utilização; esta amostra será daqui em diante designada por *liofilizado 1*.

Extracção e purificação de antocianinas

A extracção dos compostos de interesse das amostras (Fig.28) foi realizada segundo a metodologia utilizada por Spínola *et al.* [45]: adicionou-se uma solução de extracção - solução metanólica a 80% em água acidificada a 7% com ácido acético - ao liofilizado (*liofilizado 1*), numa proporção de 50 mililitros por grama de liofilizado. A mistura foi colocada no banho de ultra-sons (60 min, 35 kHz, 200 W), sendo posteriormente centrifugada, filtrada e evaporada a pressão reduzida, a uma temperatura inferior a 40°C , para remoção do metanol.

Da fase aquosa resultante foi retirada uma amostra que foi congelada, liofilizada e armazenada para posterior análise por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS) (*liofilizado 2*). A restante fracção aquosa (*extracto*) foi purificada (extracção líquido-líquido).

A extracção líquido-líquido foi realizada de acordo com a metodologia de Wang *et al.* [46] por partição da fracção aquosa, com quatro porções de 50 mL de acetato de etilo, conforme Fig.28.

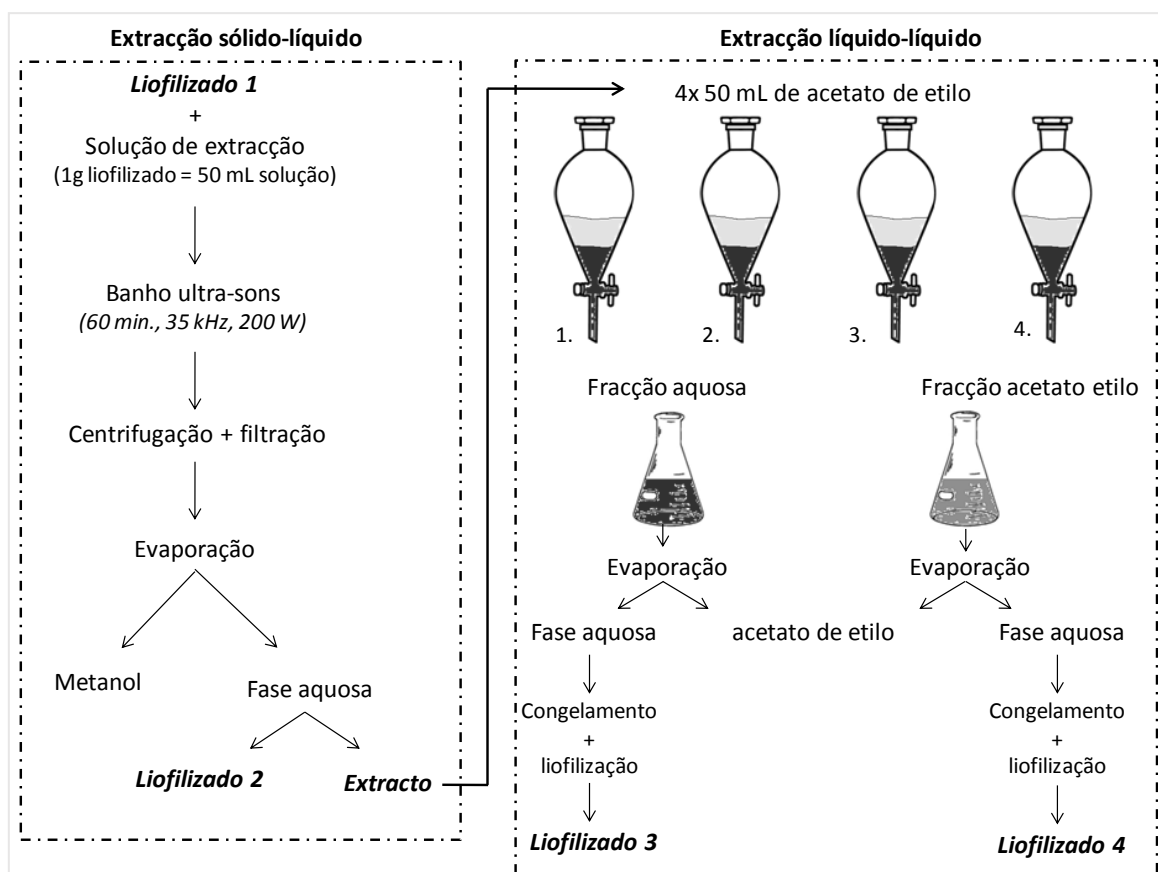


Fig. 28 – Esquematização das metodologias de extração e purificação aplicadas.

A fracção aquosa resultante do fraccionamento com o acetato de etilo foi submetida à evaporação a pressão reduzida, a fim de remover possíveis vestígios de acetato de etilo. Uma vez evaporada, foi congelada (-80 °C), liofilizada e armazenada a 4-6 °C até à sua utilização (*liofilizado 3*), constituindo o principal material para estudo.

A fracção de acetato de etilo foi evaporada, ressuspensa em água destilada, congelada (-80 °C) e liofilizada (*liofilizado 4*) para posterior análise e identificação dos compostos extraídos.

O *rendimento de extracto purificado* de cada amostra foi determinado tendo por base a seguinte equação:

$$\text{Rendimento de extracto purificado} = \frac{m_{\text{liofilizado3}}}{m_{\text{liofilizado1}}} \times 100\% \quad (\text{equação 1})$$

1.2.2. Adsorventes

Foram seleccionados para o trabalho: três argilas (NaSDN₃; SapCa-2 e SWy-2); uma resina sintética (Lewatit VP OC 1064 MD) e um talco farmacêutico.

Argila NaSDN₃

A argila NaSDN₃ foi previamente purificada de acordo com os procedimentos previamente estabelecidos por [37]. Na purificação foram removidos carbonatos, matéria orgânica e óxidos de ferro. Por fim, a argila foi separada, de forma a ser obtida uma fracção de argila constituída por partículas com tamanho < 2 µm.

Argila SapCa-2 e SWy-2

As argilas SapCa-2 e SWy-2 foram fornecidas pela Universidade de Missouri-Columbia (*Source Clay Minerals Repository*) e utilizadas conforme recebidas.

Lewatit VP OC 1064 MD

Uma amostra de resina Lewatit VP OC 1064 MD foi gentilmente cedida pelo fabricante – LANXess (Alemanha) – e foi activada antes de ser utilizada, conforme recomendação do fornecedor.

Por ser uma resina macroporosa e hidrofóbica, a sua ativação antes de ser utilizada é necessária de forma a remover o ar contido no interior dos poros. Foi aplicada a metodologia realizada por Conidi et al. [47]: a resina foi submetida a lavagens sucessivas com soluções de HCL (6%) e NaOH (4%), com utilização de água destilada entre lavagens.

A percentagem de humidade da resina foi determinada com o auxílio de uma balança de humidade; a resina apresentou uma percentagem de humidade de, aproximadamente, 63%.

Talco Farmacêutico

O talco farmacêutico foi gentilmente cedido pelo Hospital Dr. Nélcio Mendonça e foi utilizado conforme fornecido.

1.2.3. Parâmetros de trabalho

pH

Os estudos de adsorção foram realizados a pH 4,3 (de acordo com trabalhos desenvolvidos anteriormente [49] e conforme explicado mais à frente). Para o efeito, os extractos (*liofilizado 3*) foram dissolvidas em tampão fosfato 0,05 M, previamente

preparado por dissolução de dihidrogeno fostato de potássio (KH_2PO_4) em água, numa proporção de 6,80 g/L, sendo o pH aferido com NaOH e HCl para 4,3.

Massa de adsorvente e proporção solução de extrato/massa de adsorvente

A proporção de solução de extrato de antocianina/massa de adsorvente (mL/g) estipulada para todo o trabalho foi de 3 mL/ 0,03 g de adsorvente, em adaptação às proporções descritas por Abdullah *et al.* [48].

Quantificação espectrofotométrica UV-Vis de antocianina adsorvida – construção da recta de calibração de cianidina-3-glucosídeo

A quantidade de antocianina adsorvida, em miligrama de antocianina adsorvida por grama de adsorvente seco, foi determinada por análise UV-Vis_{517nm} da solução inicial e do sobrenadante após contacto com o adsorvente e calculada com recurso à equação:

$$ADS = \frac{(C_{c_{\text{solução inicial}}} - C_{c_{\text{sobrenadante}}}) \times V}{m} \quad (\text{equação 2})$$

Onde:

$C_{c_{\text{controlo}}}$ = concentração de antocianina na solução inicial de extracto (mg/L)

$C_{c_{\text{amostra}}}$ = concentração de antocianina no sobrenadante após adsorção (mg/L)

V = volume de solução de extrato de antocianina utilizado para a adsorção (L)

m = massa de adsorvente utilizado na adsorção (g, peso seco), calculado pela seguinte equação:

$$m = m_{\text{pesada}} \times \left(1 - \frac{\% \text{ humidade}}{100}\right) \quad (\text{equação 3})$$

A antocianina adsorvida após os ensaios de adsorção foi quantificada por espectroscopia UV-vis com recurso a uma recta de calibração construída por utilização de um padrão de cianidina-3-glucosídeo, com concentração inicial de 10 g/L em metanol.

A partir da recta com equação $y = 0,008x - 0,237$ e coeficiente de determinação (R^2) igual a 0,979, calculou-se a concentração de antocianina presente, tanto na solução inicial (controlo), como no sobrenadante resultante dos ensaios de adsorção. Os

resultados encontram-se expressos em miligrama de equivalente de cianidina-3-glucosídeo por litro.

Após os ensaios de adsorção, e com base na recta de calibração da cianidina-3-glucosídeo, a antocianina adsorvida em cada ensaio de adsorção foi quantificada, tendo já em consideração a percentagem de humidade do adsorvente.

Estudo do efeito da concentração da solução de extrato de antocianina

A fim de estudar a influência da concentração da solução de extracto no processo de adsorção e encontrar a concentração mais adequada para uma maior eficácia do processo, foram testadas três concentrações diferentes (5 g/L, 10 g/L e 20 g/L), por dissolução do *lioofilizado 3* em tampão (pH 4,3) (esquematizado na Fig.29).

Numa primeira aproximação, foram estipuladas 5 horas de adsorção, a fim de garantir que o equilíbrio era atingido. Este parâmetro foi otimizado posteriormente.

Foram adicionados 3 mL de solução de extrato com pH 4,3 e concentração pretendida, a 0,03 g de adsorvente. A mistura foi colocada em agitação mecânica, ao abrigo da luz, por um período de 5 horas, ao fim das quais as amostras foram centrifugadas (4000 rpm, 20 min., a 10°C); o sobrenadante foi filtrado (0,45 µm) e analisado por espectrofotometria UV-vis, em varrimento de 700-350 nm (Fig.30). Este processo foi realizado em triplicado [49]

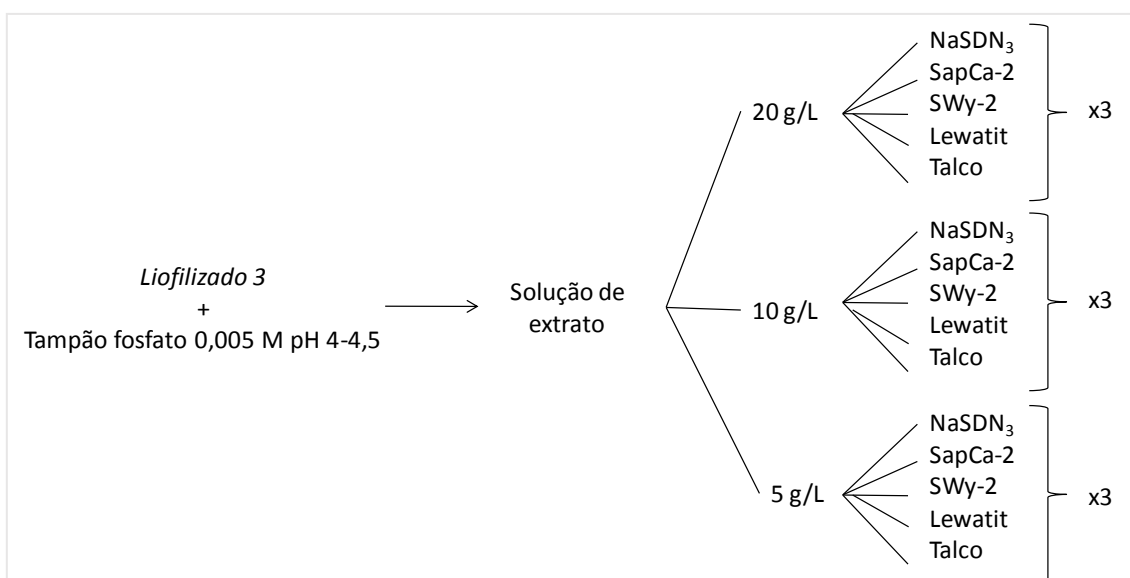


Fig. 29 – Esquematização dos ensaios de otimização da concentração da solução de extrato.

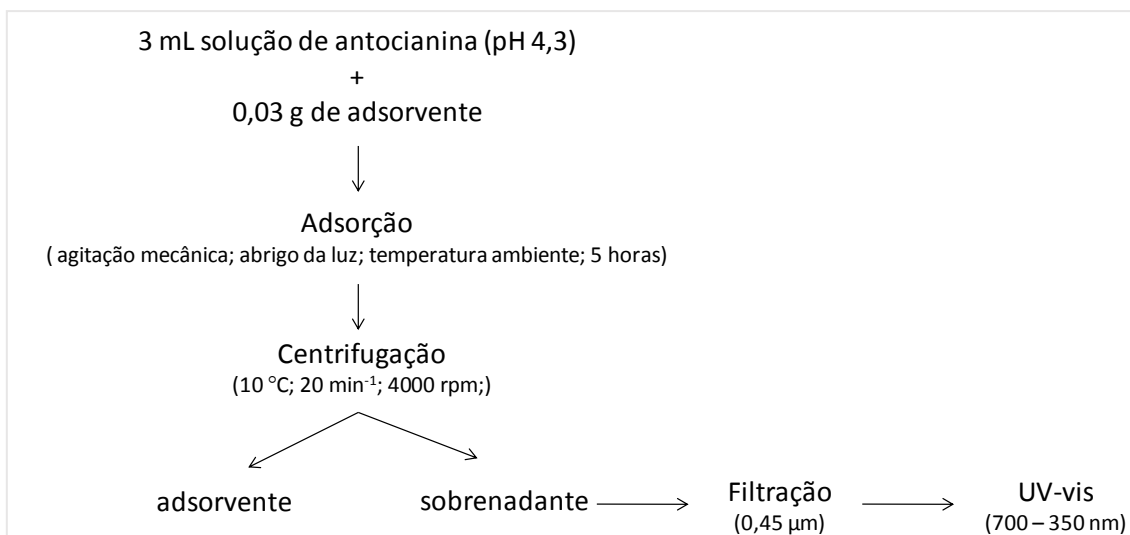


Fig. 30 – Esquematização genérica da metodologia aplicada nos ensaios de adsorção.

Optimização do tempo de adsorção – ensaios de cinética de adsorção

Os estudos de cinética de adsorção das antocianinas nas matrizes sólidas teve por base a metodologia aplicada por Buran Timothy *et al.* [50], e por Abdullah *et al.* [48], e está esquematizada na Fig.31.

Num balão de fundo redondo disposto num banho de água à temperatura ambiente (para dispersão de calor produzido pela agitação magnética), foi adicionado 50 mL de solução de extrato (5 g/L, a pH 4,3) a 0,05 g de adsorvente. A mistura foi colocada em agitação magnética e foram recolhidas alíquotas (1 mL) de mistura, de 2 em 2 minutos nos primeiros 10 minutos, e de 10 em 10 minutos no restante período de ensaio. As alíquotas foram filtradas (0,45 μm) a fim de separar o adsorvente da solução que foi, posteriormente, analisada em UV-Vis (517 nm).

A capacidade de cada adsorvente, ao longo do ensaio, foi determinada por quantificação da antocianina adsorvida (em miligrama de antocianina por grama de adsorvente), conforme anteriormente mencionado, com recurso à *equação 2*.

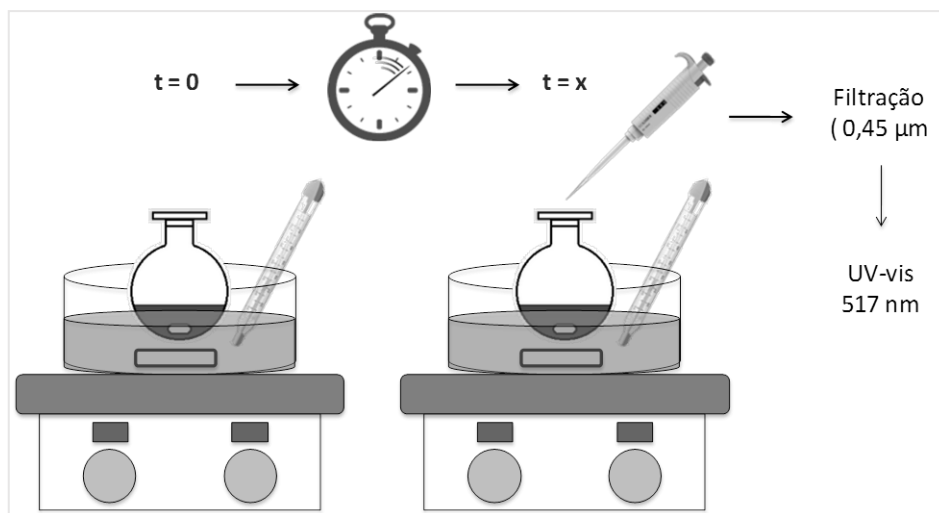


Fig. 31 - Esquematização da metodologia aplicada nos estudos de cinética de adsorção.

1.3. Resultados e discussão

1.3.1. Antocianinas

Seleção, recolha e preparação das amostras

A selecção das bagas de faia, amoras e uveiras (Madeira e Açores) como fontes naturais de antocianinas teve por base estudos publicados e trabalhos em curso no grupo de investigação, onde foram identificados vários tipos de antocianinas por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS) e devidamente quantificados por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos acopolado (HPLC-DAD). Os resultados estão na tabela 6 e encontram-se expressos em miligrama de antocianina por grama de extrato seco.

Tabela 6 - Perfil de antocianinas presente em cada fonte natural.

Fonte natural	Perfil de antocianinas	Concentração de antocianinas (mg/g de extracto seco)
Faia *	derivados de delphinidina e cianidina	29,24 ± 0,10
Amora**	derivados de cianidina	53,30 ± 1,37
Uveira da Madeira**	derivados de delphinidina, petunidina, cianidina e de malvidina	70,77 ± 1,01
Uveira dos Açores**	derivados de delphinidina, petunidina, peonidina e de malvidina	68,17 ± 1,15

* retirado de [45]

** dados da tese doutoramento do mestre Vítor Spínola, ainda por publicar e gentilmente cedidos pelo autor

A concentração de antocianina apresentada diz respeito à quantidade de antocianinas presentes no extracto bruto (correspondente ao *liofilizado* 2 do presente trabalho, sem purificação).

Como é possível observar, o conteúdo total de antocianinas nas uveiras é substancialmente superior ao da faia e da amora, confirmando a inspecção visual das amostras.

Extracção e purificação de antocianinas

A selecção da metodologia de extracção teve por base as várias recomendações descritas na literatura - específicas para antocianinas - de forma a garantir uma extracção eficaz destes compostos a partir das suas fontes naturais.

De entre todas as metodologias aplicadas na extracção de flavonóides a partir de frutos, a utilização de um solvente (extracção sólido-líquido) tem sido a mais utilizada. Por se tratar de moléculas polares, o metanol está descrito como o solvente mais eficaz na extracção de antocianinas, preferencialmente acidificado para as estabilizar [9,46,51].

A acidificação do solvente requer cuidados, não devendo ser utilizados meios muito ácidos de forma a evitar a degradação, tanto de antocianinas aciladas, como de ligações glicosídicas (no caso das antocianinas 3-monósidos). Na extracção de antocianinas, é recomendada a acidificação do metanol com um ácido fraco como o ácido acético [9]; no presente trabalho, usou-se a proporção 80: 20 (metanol: água), sendo a água acidificada a 7% com ácido acético, como procedimento *standard* no laboratório.

A liofilização permite reduzir a actividade enzimática, o que ajuda a preservar a amostra por diminuição da degradação de origem enzimática. Com a moagem, pretendeu-se torná-la mais homogénea e aumentar a área de contacto amostra/solvente, facilitando a difusão deste e aumentando a eficácia da extracção [51]. A extracção assistida por ultra sons sobre amostras liofilizadas e trituradas foi seleccionada, de entre as várias metodologias possíveis, para maximizar a extracção dos compostos de interesse (antocianinas) sem degradação, em menos tempo e à temperatura ambiente.

Uma vez que a metodologia de Spínola *et al.* [45] obedecia a todas estas especificações, foi seleccionada como a mais adequada para o presente trabalho.

Esta metodologia implica a extracção simultânea de outros compostos como

açúcares, ácidos orgânicos e proteínas. Então, e uma vez que as antocianinas eram os únicos metabolitos de interesse, foi tido como conveniente a adição de um passo adicional: a purificação do extracto por extracção líquido-líquido com acetato de etilo [46], na tentativa de remoção de açúcares, pectinas e compostos fenólicos hidrossolúveis. Aquando da aplicação desta metodologia, foi verificado que, a cada passagem pelo acetato de etilo, não só o volume da fase aquosa diminuía, como a fracção de acetato de etilo ficava progressivamente vermelha. Ambas as observações resultam das antocianinas serem solúveis no acetato de etilo que por sua vez é miscível em água (8,3 g/100 mL) [46].

A fim de perceber se este passo constituía, de facto, uma mais valia, os *liofilizados 3 e 4* – amostras pós acetato de etilo e fracção de acetato de etilo, respectivamente – foram analisados por HPLC-DAD e os resultados comparados; na Fig.32 estão representados os cromatogramas obtidos para o extracto de faia.

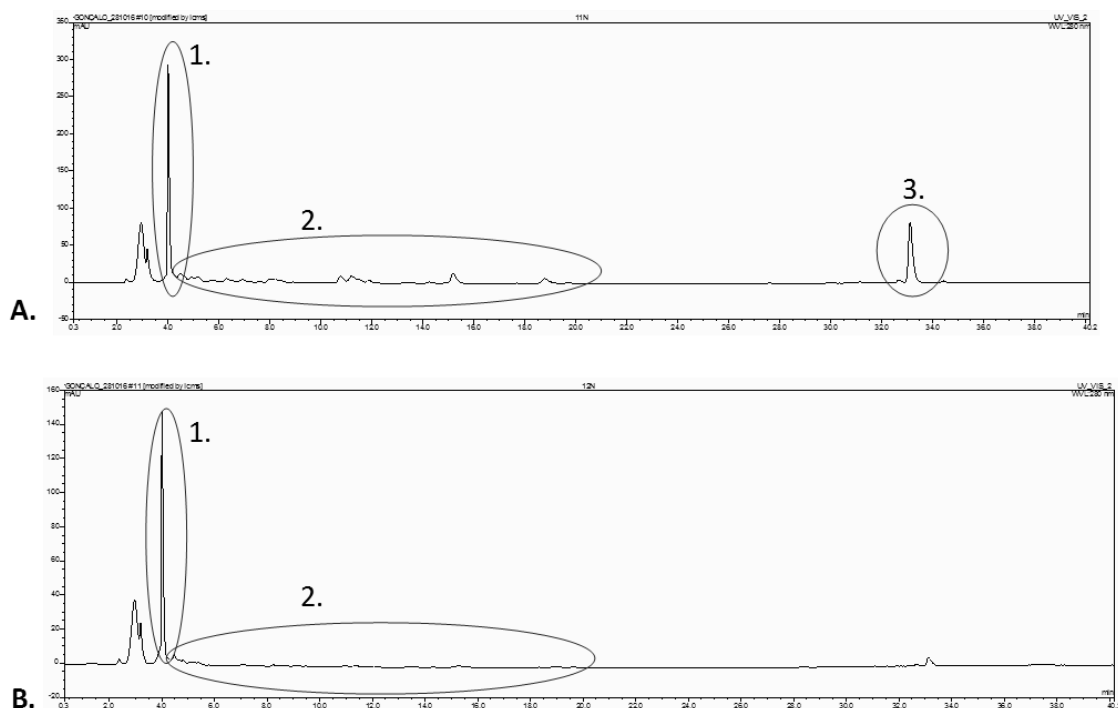


Fig. 32 - Cromatogramas obtidos por HPLC-DAD para o extracto de faia: A- fracção acetato de etilo (*liofilizado 4*); B- extracto purificação (*liofilizado 3*); 1- antocianinas; 2 e 3 – outros compostos.

Como é possível observar, no cromatograma A (fracção de acetato de etilo) foram identificados diversos compostos, assinalados: 1- antocianinas; 2 e 3 – outros compostos. Por análise do cromatograma B (extrato purificado), verificou-se que os compostos correspondentes às zonas 2 e 3 encontram-se em menor quantidade, mas a antocianina (1) aparece igualmente distribuída nas duas fracções. Estas observações

indicam que houve dissolução no acetato de etilo, tanto dos compostos indesejados (2 e 3) como de antocianina (1).

Uma vez que as antocianinas são os compostos de interesse deste trabalho, e que a quantidade retida na fracção de acetato de etilo é significativa, este passo revelou-se desvantajoso. Adicionalmente, a retenção de antocianinas na fracção de acetato de etilo (*lioofilizado 4*) tem influência directa no rendimento de extracto purificado já que tem em conta a razão entre a massa de lioofilizado obtido (*lioofilizado 3*) e a massa de lioofilizado de partida (*lioofilizado 1*).

No presente trabalho, foi tido em conta o rendimento de extracto purificado em detrimento do rendimento de extracção do extracto bruto pois o último tem apenas em conta o *lioofilizado 1* e o *lioofilizado 3*; isto seria incorrecto pois, conforme referido, os compostos de interesse (antocianinas) também são solúveis em água ficando, portanto, retidos no *lioofilizado 2* no *lioofilizado 3*. Para além disso, por o material de partida ter sido as bagas inteiras (polpa, casca e sementes), era expectável a presença de celulose, lignina, hemiceluloses e pectinas, alguns deles parcialmente solúveis em solventes orgânicos.

A quantidade de extrato purificado (mg de extracto purificado por g de *lioofilizado 1*) obtido para cada fonte natural está na tabela 7.

Tabela 7 – Quantidade de extracto purificado.

Extrato	Rendimento de extracção do extrato purificado (%)	Quantidade de extrato purificado (mg/g)
Faia	36,16 %	361,6
Amora	39,33 %	393,3
Uveira dos Açores	39,41 %	394,1
Uveira da Madeira	49,70 %	497,0

Ao analisar os resultados obtidos, verificou-se que o extrato purificado de faia apresenta a menor quantidade, em contraposição à Uveira dos Açores com maior quantidade.

Pelo motivo mencionado acima, a quantificação de antocianinas presentes nos extratos fica assim comprometida; para que a quantificação fosse correcta teria de considerar a quantidade de antocianinas presente no *lioofilizado 3* (extrato purificado) e no *lioofilizado 4* (fracção de acetato de etilo). Na realidade, aquando da quantificação de

antocianinas presente no extrato, apenas foi considerado o *liofilizado 3*, negligenciando as antocianinas retidas no *liofilizado 4*.

Na impossibilidade de repetir todo o processo de extracção por falta de material vegetal, o conteúdo de antocianinas considerado em todo o trabalho foi o quantificado pelo Mestre Vítor Spínola (conteúdo de antocianinas presente no *liofilizado 2* (extrato sem purificação)), cujos valores se encontram na tabela 6).

1.3.2. Parâmetros de trabalho

pH

O pH é um dos factores que influencia directamente, não só o processo de adsorção, como o próprio comportamento das antocianinas. Um trabalho anterior [49] onde foi estudado a influência do pH no processo de adsorção de antocianinas naturais a matrizes orgânicas e inorgânicas (em diferentes valores de pH) revelou que quanto menor o pH da solução de antocianina, maior é a eficácia de adsorção.

Por esta ordem de ideias, o pH indicado para o presente trabalho seria o mais baixo, nomeadamente pH 1,5. Contudo o pH 4,3 foi definido como o mais apropriado pois foi observado que não só a diferença de conteúdo de vermelho (%RE pelo Método de Glories) em ambos os pH's era insignificante (nomeadamente, cerca de 68,77% a pH 1,5 e 62,13% a pH 4,5), como também foi a pH 4,5 que foi verificado, espectrofotometricamente, uma maior absorvância aos ~517 nm (Fig.33) [49].

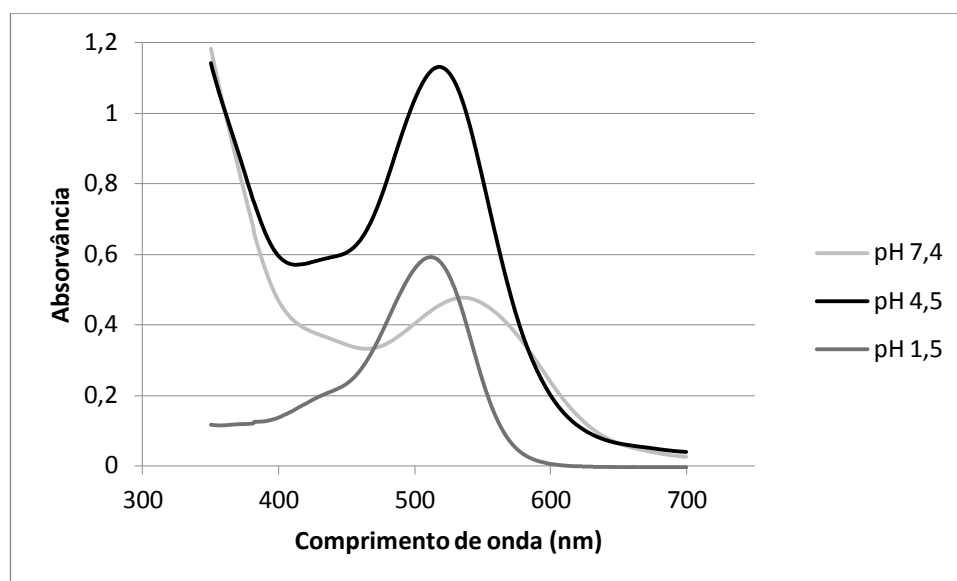


Fig. 33 - Espectro de varrimento de UV-Vis (350-700 nm) de uma solução de extracto de faia a diferentes pH's.

A selecção do pH 4,5 também teve por base os adsorventes em estudo, mais especificamente a resina sintética Lewatit porque, em gamas de pH 1-2, o processo de adsorção das antocianinas nas resinas sintéticas apolares é desfavorecido. Por outro lado, em gamas de pH 4-4,5 a capacidade de adsorção nas resinas é aumentada por diminuição da polaridade das espécies em equilíbrio [26].

A dissolução da mesma massa de *liofilizado 3* das várias amostras conduziu a soluções com intensidade de cor variável, uma vez que esta depende do coeficiente de extinção das várias antocianinas e este é dependente das respectivas estruturas moleculares [9]. Isto porque, como referido anteriormente, o perfil de antocianinas é diferente nos quatro extratos, sendo que a faia e a amora têm a mesma antocianina maioritária, nomeadamente a cianidina-3-glucosídeo, enquanto as uveiras (Açores e Madeira) são constituídas por uma mistura de diferentes antocianinas. Também a concentração total de antocianinas nas amostras é diferente - idênticas nas uveiras da Madeira e Açores (70,77 mg/g e 68,17 mg/g); cerca de 53,30 mg/g na amora e 29,24 mg/g na faia – o que influencia directamente a coloração final do extrato.

Quantificação espectrofotométrica de antocianina adsorvida – determinação do comprimento de onda de absorção da antocianina

Existem muitas metodologias de quantificação de antocianinas descritas na literatura que se baseiam na espectrofotometria (desde o método do pH diferencial,

métodos subtrativos, entre outros); mas para muitos dos métodos descritos o coeficiente de absorvidade é obrigatório na determinação da quantidade de antocianina presente [6].

No presente trabalho o referido coeficiente era uma incógnita visto que se trabalhou com misturas complexas de diferentes antocianinas e não com antocianinas puras. Assim sendo, o método de quantificação selecionado foi a espectrofotometria UV-Vis, não só por se tratar de método simples e barato, mas também porque as características espectrais das antocianinas fornecem informações quantitativas e qualitativas úteis. [6,9].

Nesta metodologia o conteúdo total de antocianinas em extratos com misturas é determinado pela medição da absorvidade da solução num único comprimento de onda, já que estas moléculas apresentam uma banda de absorção característica na região entre 490-550 nm do espectro visível (UV-vis). A presença de outros polifenóis na mistura poderia constituir um problema na quantificação, o que não se verifica pois a região característica de absorção das antocianinas é distinta das de outros compostos polifenólicos (com máximo de absorção na região ultra violeta (UV)), o que torna a utilização desta metodologia segura [6].

A quantificação da antocianina adsorvida (mg) por grama de adsorvente realizada neste trabalho é o resultado da diferença de absorção entre a solução inicial de extrato de antocianina (A_0) e a absorção do sobrenatante da adsorção (A_f), a 517 nm.

Quando a metodologia espectrofotométrica de quantificação de antocianinas é utilizada, e conforme descrito, é desejável que os resultados obtidos sejam expressos de forma a ser possível a comparação entre trabalhos e laboratórios diferentes [6]. Então os resultados foram expressos em miligrama de equivalentes de cianidina-3-glucosídeo por litro - com o auxílio da recta de calibração traçada com um padrão de cianidina-3-glucosídeo - já que é a antocianina mais abundante na natureza. Esta estratégia permite a determinação da quantidade total de antocianina presentes, mesmo quando é impossível identificar todos os pigmentos envolvidos [6].

No referido estudo de influência do pH no processo de adsorção [49], e por análise UV-Vis (700-400 nm) das soluções de extrato de antocianinas a diferentes pHs, constatou-se que o pico máximo de absorção das antocianinas variava. Isto vai de encontro ao descrito na literatura que refere que o solvente utilizado para as determinações espectrais afecta a posição das bandas de absorção. No caso do estudo em questão, e pelos solventes se tratarem de tampões com pH diferentes, as variações

observadas ao nível do deslocamento do pico máximo de adsorção são o resultado das transformações estruturais que as antocianinas sofrem com a alteração do pH [6].

Foi fundamental conhecer a absorção máxima das antocianinas nas condições de pH em estudo, de modo a se proceder a uma correcta quantificação e avaliação do processo de adsorção propriamente dito. É assim justificada a análise espectrofotométrica das soluções de extrato de antocianina (varrimento 700 – 400 nm) de forma a identificar o máximo de absorção no pH em estudo (4,3). Foi observado que o máximo se dava por volta dos 517nm; este desvio cromático, em relação ao catião *flavilium* é justificado pela desprotonação de um dos grupos OH que se encontram nas posições 4' e 7' da estrutura das antocianinas, e que contribui para alterações na sua cor [11].

Este foi o valor tomado como referência para, posteriormente, se proceder à quantificação da antocianina: em solução e adsorvida.

Após a realização dos ensaios de adsorção, por análise e tratamento dos dados espectrofotométricos, verificou-se variações no máximo de absorção da antocianina, tornando o valor dos 517 nm, previamente definido como máximo de absorção, incorrecto.

Assim sendo, para que a quantificação de antocianina adsorvida fosse correcta, estudou-se a influência da variação do máximo de absorção da antocianina na determinação do teor total de antocianina presente em solução. Para isso, na solução de extrato de faia a 20 g/L, quantificou-se a antocianina adsorvida: a 517 nm e no máximo de absorção obtido espectrofotometricamente (tabela 8).

Posteriormente, e tendo em conta a massa de adsorvente utilizado em cada ensaio, foi possível determinar a quantidade de antocianina adsorvida por grama de adsorvente [6].

Tabela 8 - Quantificação de antocianina adsorvida (mg) por grama de adsorvente (peso seco).

	Solução extrato de faia (20 g/L)						
	517 nm			Abs máx.			λ máx. (nm)
NaSDN ₃	32,84	±	0,37	32,81	±	0,37	524
SapCa-2	35,72	±	0,54	35,69	±	0,54	527
SWy-2	35,04	±	0,23	35,00	±	0,23	526
Lewatit	68,28	±	1,05	68,06	±	1,03	522
Talco	9,50	±	0,48	29,57	±	0,38	518

Como se constata, após o tratamento dos dados e respectiva quantificação da antocianina adsorvida, não existem variações para as argilas e para a resina Lewatit. No caso específico do talco, são verificadas diferenças significativas que podem estar associadas a erros experimentais.

Assim sendo, e por uma questão de conveniência, ficou estabelecido a absorção máxima das antocianinas aos 517 nm como comprimento de onda único a ter em consideração na quantificação espectrofotométrica destes compostos.

Estudo do efeito da concentração da solução de extrato de antocianina

Os resultados dos ensaios de adsorção, das antocianinas da faia, a diferentes concentrações de solução inicial de extrato e para os diferentes adsorventes, encontram-se compilados na Fig.34.

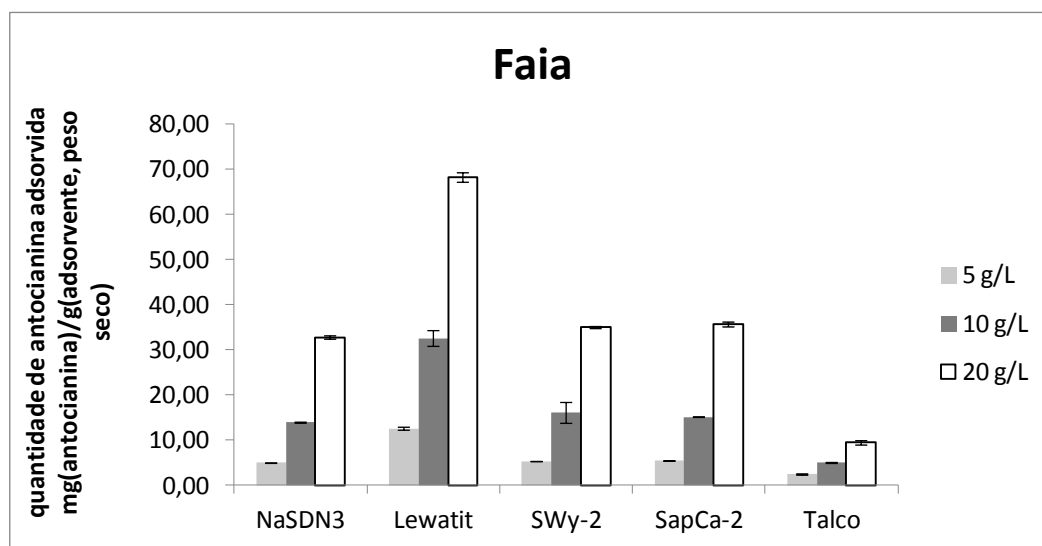


Fig. 34 – Quantidade de antocianina adsorvida, em função da concentração de solução inicial de extrato de faia.

Como é possível observar, a quantidade de antocianina adsorvida variou proporcionalmente com a concentração da solução inicial de extrato; isto é, quanto maior a concentração da solução de extrato inicial, maior foi a quantidade de antocianina adsorvida por grama de adsorvente (seco). Esta tendência foi verificada para todos os adsorventes (Fig. A1, Fig. A2 e Fig. A3, *ver anexo*), e indica que os mesmos não estão a atingir a saturação.

Este comportamento também foi verificado por Bulut et al. [52] e pode estar relacionado com uma grande apetência para a transferência de massa, pois o processo de

adsorção é altamente dependente da concentração da solução, na medida em que quanto maior for a concentração da solução de sorbato, mais eficaz é a sua adsorção.

Assim, por conveniência, e por motivos de poupança – de extrato e de solventes - estabeleceu-se a concentração 5 g/L, independentemente do extrato, a ser utilizada ao longo de todo o trabalho.

Estudo da capacidade e mecanismo de adsorção dos adsorventes com base na quantidade de antocianina adsorvida

Estudo da capacidade de adsorção dos adsorventes

Na tentativa de perceber se o extrato de antocianina utilizado influenciava o processo de adsorção propriamente dito, comparou-se a capacidade de adsorção dos adsorventes, por análise da quantidade de antocianina adsorvida, à mesma concentração (5 g/L), para todos os extratos e adsorventes. Os resultados obtidos estão compilados na Fig.35.

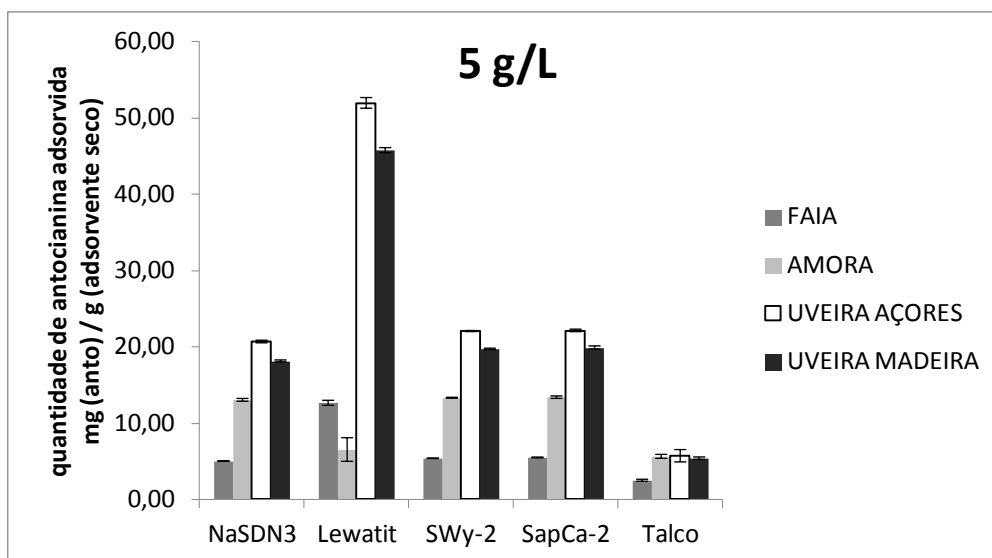


Fig. 35 - Quantidade de antocianina adsorvida, em todos os adsorventes, a partir de soluções iniciais de extrato (5 g/L).

Tomando a argila NaSDN₃ como exemplo, foi observado que a maior quantidade de antocianina adsorvida corresponde ao extrato de uveira dos Açores, seguido-se os extratos da uveira da Madeira, amora e faia. A mesma tendência foi verificada para os restantes adsorventes em estudo e, tal como já mencionado, está relacionada com o conteúdo de antocianinas presentes em cada extrato, quer a nível quantitativo

(concentração total de antocianinas), quer a nível qualitativo (estruturas das antocianinas que constituem cada extrato).

Uma vez que os resultados obtidos a partir dos dois extratos de uveiras (da Madeira e dos Açores) são idênticos, foi decidido que para o restante trabalho apenas seria utilizado o extrato de uveira dos Açores; esta decisão também se baseou na escassez de material vegetal da uveira da Madeira.

Foram, igualmente, verificadas diferenças entre os adsorventes, nomeadamente ao nível da capacidade de adsorção de cada um; concluiu-se que as referidas diferenças se deviam às características específicas de cada um, sendo, então, possível organizá-los por ordem crescente de eficiência de adsorção em: Talco < NaSDN₃ < SWy-2 < SapCa-2 < Lewatit.

Segundo esta ordem verificou-se que o talco foi o adsorvente com menos capacidade de adsorção, contrariamente à Lewatit que, de todos os adsorventes, apresentou a maior capacidade de adsorção; já as argilas apresentaram uma capacidade de adsorção intermédia, mas idêntica entre as três. Apesar de terem sido verificadas algumas exceções a esta tendência, nomeadamente no que diz respeito ao talco e à resina Lewatit (Fig. A2, *ver anexo*), foram associadas à dificuldade de manutenção de homogeneidade dos sistemas nas condições experimentais utilizadas e, por isso, desconsideradas.

Assim, e por análise da capacidade de adsorção de cada um dos adsorventes, foi possível estabelecer comportamentos de adsorção entre os diferentes adsorventes. Os adsorventes foram, então, classificados em dois grupos: adsorventes laminares (argilas) e adsorventes não-laminares (resina Lewatit e talco).

Estudo do mecanismo de adsorção dos adsorventes

Para o estudo dos mecanismos de adsorção envolvidos no processo de adsorção das antocianinas aos adsorventes, e de modo a simplificar a discussão dos resultados, foi tido em conta a classificação referida anteriormente (materiais laminares e materiais não-laminares).

Adicionalmente, foi assumido que os materiais laminares apresentam um mecanismo de adsorção idêntico entre si já que as três argilas em estudo revelaram capacidades de adsorção idênticas e as suas estruturas são consideradas análogas (montmorilonites e saponites) [2].

Também foi assumido que o mecanismo de adsorção dos materiais não-laminares é distinta da dos materiais laminares; isto porque, em termos quantitativos, as capacidades de adsorção revelaram-se distintas (superiores no caso da Lewatit e inferiores para o talco, comparativamente às argilas).

É fundamental ter em consideração que, independentemente do tipo de adsorvente em questão, as adsorções foram realizadas a partir de soluções de extracto, o que dificulta o processo de adsorção já que são constituídas por uma mistura de compostos (comparativamente a soluções de compostos puros). A existência de possíveis competições entre as antocianinas e outros compostos fenólicos, para além dos inúmeros mecanismos propostos para a adsorção de solutos aromáticos [34], são outros factores que tornam difícil o estudo dos mecanismos envolvidos no presente trabalho.

Também por indisponibilidade de técnicas mais precisas – como a difracção de raios X (XRD) e a determinação da área de superfície (BET) - não foi possível realizar a caracterização de cada adsorvente (no que diz respeito a tamanho dos poros, tamanho das partículas, áreas de superfície, distância entre lâminas, cargas de superfície, entre outras).

Por todos os factores acima referidos, a discussão dos mecanismos de adsorção baseou-se, apenas, no possível tipo de interações estabelecidas entre as antocianinas e os adsorventes laminares e não-laminares; a presença de outros compostos concorrentes foi negligenciada.

Materiais laminares

No que diz respeito aos materiais laminares, e independentemente da quantidade de antocianina adsorvida, foi possível concluir que o processo de adsorção ocorreu conforme esperado já que os híbridos (argila + antocianina) apresentaram uma coloração avermelhada que é característica das antocianinas. Para além disso, foi possível observar que a intensidade da coloração apresentada pelos híbridos foi proporcional à concentração da solução inicial de extrato, isto é, a coloração dos híbridos foi tanto mais intensa quanto mais concentrada a solução de extracto de antocianina utilizada.

Estas observações foram de encontro ao esperado, e de acordo com a descrição de Teixeira-Neto *et al.* [21] que intercalou antocianina de extrato de açaí em duas das

argilas utilizadas no presente trabalho, nomeadamente a montmorilonite SWy-2 e a saponite SapCa-2, ambas classificadas como esmectites.

Caso tivesse sido possível analisar os híbridos por XRD, e como explicado por Teixeira-Neto *et al.* [21], o expectável seria observar um aumento do espaço basal das argilas que, idealmente, se revelaria tanto maior quanto mais concentrada a solução de extrato utilizada (directamente relacionada com a quantidade de antocianina adsorvida) [2]. Este fenómeno é o resultado da capacidade que as argilas têm de se expandir em meio aquoso, promovendo a intercalação das antocianinas no interior da sua estrutura, mais precisamente entre as lâminas [21].

Teixeira-Neto *et al.* [21] refere que também existe a possibilidade das antocianinas apenas serem adsorvidas na superfície externa do adsorvente, por não terem sido verificadas diferenças no espaço basal das argilas [21].

Independentemente das antocianinas estarem adsorvidas na superfície externa ou entre as lâminas da argila, o tipo de interacção estabelecida é a mesma. Conforme sugere Lima *et al.* [53] as argilas, por serem predominantemente ácidas, adsorvem selectivamente as antocianinas, estabelecendo interacções fortes com os grupos Al-O dos adsorventes (preferencialmente no alumínio tetraédrico). Assim, o alumínio presente na estrutura destes aluminossilicatos são pontos específicos e adequados para adsorver as antocianinas por meio do estabelecimento de interacções fortes [53].

A orientação que as antocianinas tomam ao serem imobilizadas no adsorvente, é outro factor que tem influência directa na quantidade de antocianina adsorvida. As antocianinas são moléculas catiónicas planares que possuem anéis aromáticos na sua estrutura (perpendiculares ao catião *flavilium*). Quando a concentração de antocianina é baixa, estes compostos são adsorvidos por intercalação no espaço entre lâminas ao assumirem uma posição paralela às lâminas da argila. Por outro lado, quando a concentração de antocianina é elevada, estas moléculas adoptam uma orientação perpendicular por favorecimento das interacções π - π (partilha de electrões) com as espécies adjacentes [21,24].

Conforme explica Teixeira-Neto *et al.* [21] existem muitas hipóteses propostas para explicar a orientação das antocianinas aquando da adsorção nas argilas; podem assumir uma posição perpendicular às lâminas dos adsorventes, ou podem formar uma bicamada de moléculas adsorvidas paralelamente às lâminas. Ao tomar a cianidina-3-glucosídeo como referência, e após simular as dimensões desta antocianina na sua conformação mais estável - 12 x 6.3 x 12 Å (Fig.36) – foi concluído que o espaço basal

entre as lâminas das argilas é suficiente para que as antocianinas sejam adsorvidas, tanto paralelamente ($12 \times 12 \text{ \AA}^2$), como perpendicularmente ($12 \times 6.3 \text{ \AA}^2$), de forma a equilibrar as cargas [21].

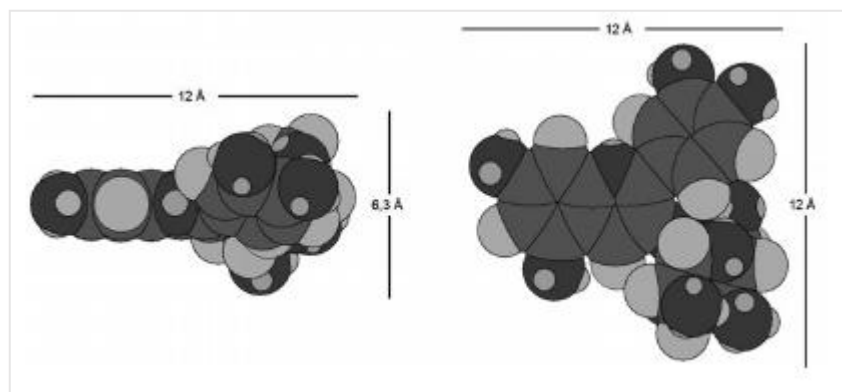


Fig. 36 - Modelos de preenchimento espacial da cianidina-3-glucosídeo [21].

Não foi possível tirar conclusões, nem acerca da orientação real das antocianinas adsorvidas, nem sobre a localização exacta de adsorção nas argilas; tendo em conta a coloração avermelhada que os híbridos apresentavam, foi, pelo menos, possível concluir, que são estabelecidas interacções entre as antocianinas e a estrutura das argilas.

Materiais não-laminares

Nos materiais não-laminares o mecanismo envolvido na adsorção das antocianinas aos adsorventes é diferente relativamente aos materiais laminares.

No caso das resinas poliméricas, a eficiência de adsorção de polifenóis é influenciada pela estrutura química da própria resina e pelos grupos funcionais presentes à sua superfície. Isto porque neste tipo de adsorvente a adsorção dá-se por estabelecimento de interacções (hidrofóbicas, pontes de hidrogénio ou interacção aromática) entre os polifenóis e a resina [34,50].

Estudos indicam que resinas polares ou apolares são viáveis para a adsorção de antocianinas já que estas contêm, tanto grupos apolares (fenilalil), como grupos polares (multihidroxi) [5,26].

Adicionalmente, as resinas sintéticas são polímeros macroporosos, o que resulta numa grande capacidade de adsorção: os poros cilíndricos e esféricos permitem que sejam estabelecidas mais interacções entre os átomos da superfície da resina e o composto pretendido. [5,26,35]

No caso específico da resina Lewatit, por ser uma resina não funcionalizada (sem grupos funcionais na sua superfície), e por ser macroporosa (com diâmetros de poro a rondar os 50-100 Å) o mecanismo de adsorção envolvido poderá se basear numa maior afinidade antocianina/resina, do que antocianina/solução; daqui resulta a adsorção das antocianinas por entrada nos poros - já que as suas dimensões rondam os 12 x 6.3 x 12 Å - onde estabelecem interacções do tipo *van der Waals* ou pontes de hidrogénio com a resina [26,34].

Uma vez que as antocianinas são moléculas pequenas comparativamente ao diâmetro do poro, então cada poro pode adsorver várias moléculas de antocianinas; daí a grande capacidade de adsorção desta resina, também verificada no presente trabalho [26,34].

Para além disto, as resinas apresentam uma grande vantagem - principalmente neste trabalho específico onde o meio reaccional é uma solução de extrato e não de antocianinas puras - as resinas, conforme descrito, não interagem com açúcares/glicosídeos; isto é o mesmo que dizer que há menos uma classe de compostos a competir com as antocianinas pelos poros das resinas, o que faz aumentar a capacidade de adsorção de antocianinas por estes polímeros [50].

Então, pela falta de técnicas de análise de superfícies de adsorventes, não foi possível, novamente, concluir acerca do mecanismo de adsorção, em concreto, envolvido na adsorção de antocianinas às resinas. O facto do trabalho ter sido realizado com soluções de extrato em detrimento de soluções de antocianinas puras também impossibilitou a utilização de possíveis técnicas de identificação e monitorização de antocianinas (fluorescência ou utilização de sondas, por exemplo).

Quanto ao talco, por ser altamente inerte do ponto de vista químico [39,41], o mecanismo envolvido na adsorção das antocianinas neste adsorvente não deverá ter por base interacções fortes entre ambos.

Contrariamente à maioria das argilas, este adsorvente apresenta uma carga de superfície quase nula que se manifesta na sua incapacidade de expansão em meio aquoso; para além disto, as suas partículas individualizadas apresentam um elevado carácter hidrofóbico. Adicionalmente, os oxigénios presentes à superfície do talco não partilham com facilidade os seus pares de electrões; são considerados electrostaticamente saturados e, por isso, incapazes de estabelecer pontes de hidrogénio [34].

As antocianinas, provavelmente, são adsorvidas apenas à superfície externa do talco, processo que é dificultado pela resistência dos oxigénios em partilhar electrões a fim de serem estabelecidas interacções entre ambos. Isto explica que, no presente trabalho, o talco se tenha revelado o adsorvente com menor capacidade de adsorção, quando comparado aos restantes adsorventes estudados. Contudo, não foi possível averiguar se este é, de facto, o mecanismo envolvido na adsorção das antocianinas ao talco.

Como referido, por impossibilidade de utilização de técnicas mais precisas, em nenhum dos grupos de materiais (laminares e não laminares) foi possível concluir acerca da localização das antocianinas adsorvidas/imobilizadas. Daí a hesitação na designação pois não foi possível determinar se as antocianinas estão retidas no interior dos poros/galerias do sólido ou apenas imobilizadas na superfície.

Por comodidade ficou estipulado que, ao longo de todo o trabalho, os adsorventes carregados serão mencionados como contendo antocianinas imobilizadas.

Efeito do tempo de adsorção – ensaios de cinética de adsorção

Como já mencionado, o processo de adsorção pode ser aplicado como técnica de separação/purificação/estabilização, por imobilização da substância alvo num adsorvente. Independentemente do fim a que se destina, o processo está dependente de diversas variáveis: natureza e características da substância alvo, bem como a sua concentração e pH da solução, temperatura, características do adsorvente, proporção adsorvente/soluto, entre outros [54].

Uma das variáveis da qual o processo de adsorção também está dependente é o tempo; em conjunto com todas as outras variáveis, o tempo de adsorção maximiza a quantidade de molécula adsorvida, por contacto com o adsorvente, numa proporção directa e até que seja atingido o equilíbrio [52]. O tempo de adsorção é, portanto, uma das variáveis com mais influência na eficácia do processo de adsorção.

Por outro lado, a eficácia do processo de adsorção também está dependente do próprio adsorvente e, consequentemente, das suas características: capacidade de adsorção (dependente da molécula em questão), área de superfície, porosidade, polaridade, entre outras [48].

Assim sendo, a previsão da cinética de adsorção é fundamental pois permite avaliar as qualidades de um bom adsorvente no que diz respeito ao tempo necessário para adsorver um composto em particular [48].

Foi neste sentido que foram definidos os objectivos desta etapa experimental: como principal temos a optimização do tempo de adsorção - de forma a que a quantidade de antocianina adsorvida fosse maximizada, no mínimo período de tempo possível (factor de extrema relevância à escala industrial) – e como secundário, o estudo do comportamento e do desempenho de cada adsorvente seleccionado, ao longo do tempo, nas condições de adsorção já optimizadas [48,54].

Tanto o estudo do comportamento/desempenho dos adsorventes ao longo do processo de adsorção, como a determinação da capacidade máxima de adsorção de cada um deles teve por base a espectrofotometria UV-Vis (a 517 nm).

A capacidade máxima de adsorção de cada adsorvente foi determinada no equilíbrio, momento a partir do qual é dado por “terminado” o processo de adsorção, sendo o equilíbrio classificado como dinâmico já que a quantidade de soluto que é adsorvido é igual à quantidade que, simultaneamente, é libertada do adsorvente [48].

Neste trabalho, o equilíbrio foi definido pelo momento a partir do qual foram obtidos valores de absorvância semelhantes, em diferentes leituras UV-Vis (517 nm) realizadas ao longo do tempo, o que traduz uma concentração de antocianina em solução constante.

Em todos os adsorventes foi verificado que, mesmo após o processo de adsorção ter sido dado por concluído, o sobrenadante ainda apresentava coloração avermelhada remanescente da solução inicial, indicando que nenhum dos adsorventes teve a capacidade de adsorver todo o conteúdo de antocianina presente em solução.

Estas observações vão de encontro aos dados obtidos aquando da optimização da concentração de solução de extracto a utilizar: observou-se que, para a mesma quantidade de adsorvente, a quantidade de antocianina adsorvida era proporcional ao aumento da concentração de solução de extracto - a solução de 20 g/L deu origem a uma quantidade de antocianina adsorvida de, aproximadamente, o dobro em relação à solução de 10 g/L, que por sua vez também deu origem ao dobro da quantidade de antocianina adsorvida da solução de 5 g/L – o que indica que nenhum dos adsorventes se encontra saturado.

Ao longo dos ensaios de cinética de adsorção foi verificado que a intensidade da solução de extracto diminuía ao longo do tempo. Esta observação traduz a diminuição

da concentração de antocianina em solução, como resultado da sua imobilização nas matrizes sólidas.

A quantidade de antocianina adsorvida (mg/g), ao longo do tempo, para cada adsorvente e solução de extrato, encontra-se na tabela 9.

Tabela 9 - Quantidade de antocianina adsorvida (mg (anto)/g (adsorvente seco)): comparação da quantidade adsorvida aos 2 minutos de adsorção e no equilíbrio.

	Quantidade de antocianina adsorvida (mg antocianina/ g adsorvente seco)								
	Faia 5 g/L			Amora 5 g/L			Uveira Açores 5 g/L		
	2 minutos	equilíbrio	% adsorção 2 minutos	2 minutos	equilíbrio	% adsorção 2 minutos	2 minutos	equilíbrio	% adsorção 2 minutos
NaSDN₃	4,71	6,50	72%	11,24	13,65	82%	14,47	17,94	80%
SapCa-2	6,49	6,74	96%	9,11	14,32	63,61%	20,62	21,09	97%
SWy-2	5,67	6,45	87%	14,09	14,48	97%	19,91	20,71	96%
Lewatit	8,20	16,67	49%	10,23	36,82	27%	3,61	42,49	8%
Talco	2,55	3,40	75%	2,50	6,08	41%	0,23	2,22	10%

Por análise das quantidades de antocianina adsorvida (mg/g), foi possível verificar uma tendência: passados apenas 2 minutos desde o início da adsorção as argilas (NaSDN₃, SapCa-2 e SWy-2) já tinham atingido uma % elevada da sua capacidade máxima de adsorção, nas condições experimentais. Já a resina sintética Lewatit e o talco apresentaram % de adsorção baixas.

Aos 2 minutos de adsorção, foi ainda possível observar que, nos materiais laminares, a quantidade de antocianina adsorvida é proporcional à concentração de antocianina presente no extracto; isto é, o extracto de uveira dos Açores, que corresponde ao extracto com maior concentração de antocianina, originou maior quantidade de antocianina adsorvida, comparativamente aos restantes extratos. Nos materiais não-laminares foi verificado o contrário, o que pode estar relacionado com a complexidade do próprio extrato (já que apresenta mais estruturas diferentes de antocianinas, comparativamente ao extrato de faia, por exemplo). A complexidade do extrato pode resultar na necessidade de mais tempo para o processo de adsorção.

De forma a simplificar a interpretação do comportamento cinético de adsorção dos adsorventes em estudo, e tal como Buran *et al.* [50] e Abdullah *et al.* [48], os resultados obtidos nos estudos de cinética de adsorção foram apresentados sob a forma de gráfico:

quantidade de antocianina adsorvida (em miligrama de antocianina por grama de adsorvente) vs. tempo de contacto/adsorção (em minutos).

Analisando os dados obtidos nos ensaios de cinética de adsorção na sua globalidade – independentemente do adsorvente e da solução de extrato de antocianina – verificou-se que a quantidade de antocianina adsorvida (mg/g) é proporcional ao tempo de contacto; isto é, ao longo do tempo de adsorção, foi verificado um aumento da quantidade de antocianina adsorvida (mg/g), até à situação de equilíbrio.

Esta tendência encontra-se exemplificada na Fig.37, foi verificada para todos os adsorventes (Fig. A4, Fig. A5, Fig. A6 e Fig. A7, *ver anexos*), e vai de encontro ao esperado, de acordo com os fundamentos do processo de adsorção e também foi verificado por Bulut e Haluk [52].

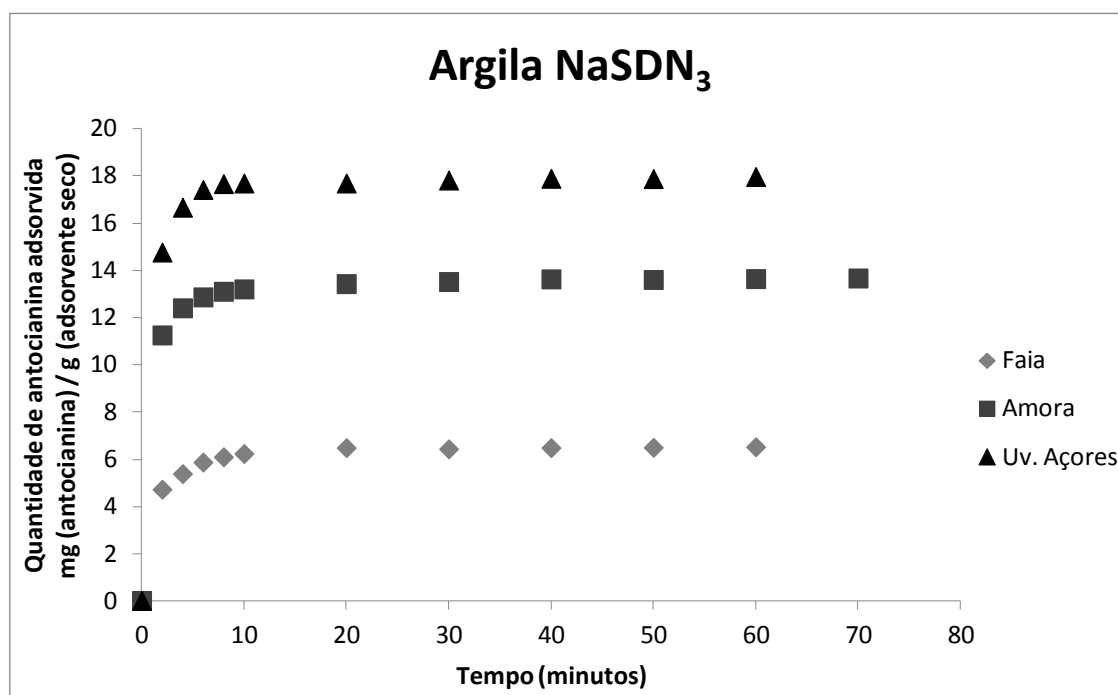


Fig. 37 - Curva de cinética de adsorção de extracto de antocianina de faia, amora e uveira dos Açores (5 g/L) na argila NaSDN₃.

Apesar de todos os adsorventes apresentarem a mesma tendência cinética ao longo do tempo, foram verificadas diferenças ao nível da “velocidade” do processo de adsorção.

No caso dos materiais laminares (argilas) (Fig. 37 e Fig. A4 e Fig. A5 dos anexos) foi notória a eficiência de adsorção logo nos primeiros 2 minutos, após os quais foi verificado um abrandamento na adsorção, até ao momento de equilíbrio (aos 20 minutos

de adsorção, aproximadamente). Nestes materiais o equilíbrio é atingido rapidamente: a argila NaSDN₃ (Fig.37), por exemplo, ao fim de cerca de 10 minutos já havia atingido o equilíbrio, sendo que nos 2 minutos iniciais já apresentava cerca de 70% da quantidade total de antocianina adsorvida.

Quanto aos materiais não-laminares, na Fig.38 está exemplificado o comportamento cinético da resina sintética Lewatit. Como é possível observar, apesar de este adsorvente demorar mais tempo a atingir o equilíbrio (cerca de 60 minutos), a capacidade de adsorção é maior, comparativamente às argilas.

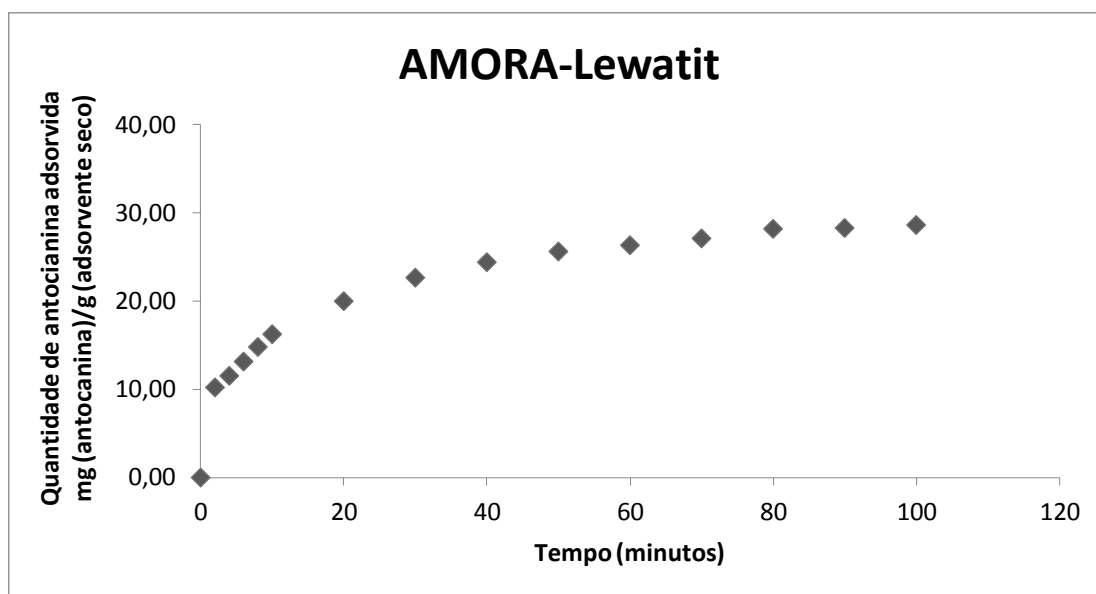


Fig. 38 - Curva de cinética de adsorção de extracto de antocianina de amora (5 g/L) na resina lewatit.

No que respeita ao outro material não-laminar, o talco (Fig. 39 e Fig. A7 dos anexos), foi considerado o adsorvente menos eficiente: para além de apresentar a capacidade de adsorção mais baixa, não foi possível observar situação de equilíbrio, mesmo após 120 minutos de ensaio.

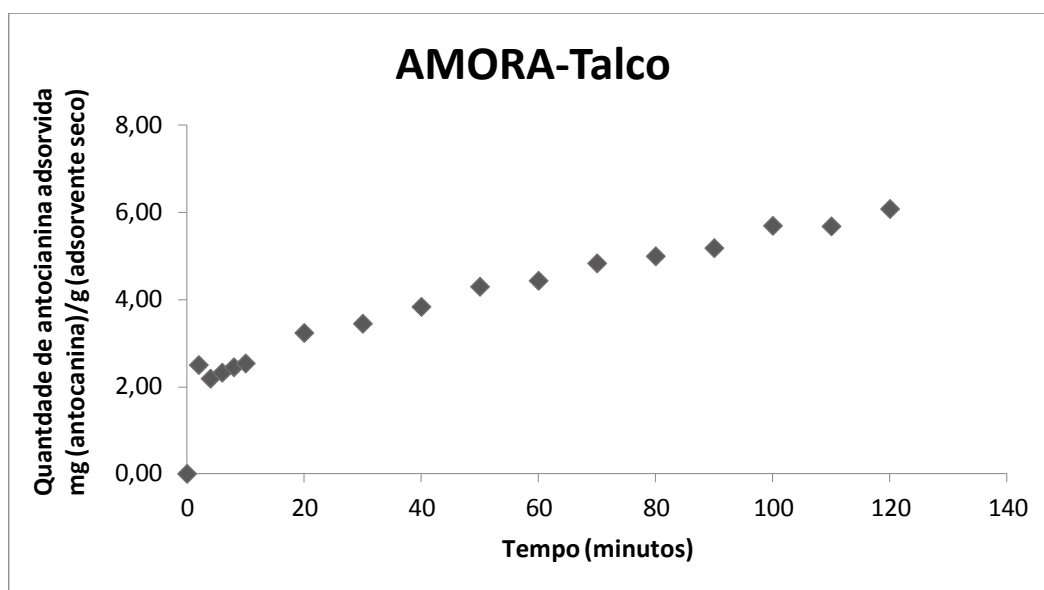


Fig. 39 - Curva de cinética de adsorção de extracto de antocianina de amora (5 g/L) no talco.

Para além das próprias características dos adsorventes que favorecem o processo de adsorção – área de superfície específica, diâmetro do poro, polaridade, entre outras – também a metodologia utilizada tem uma grande influência na eficiência de adsorção [48].

A metodologia aplicada durante os estudos de cinética, e tal como anteriormente descrito, envolve a agitação da mistura reaccional, o que constitui uma vantagem na eficácia do processo de adsorção, originando situações de equilíbrio em apenas 2 minutos, conforme descrito por Fan *et. al.* [54]. Este facto é o resultado da dispersão das partículas sólidas dos adsorventes pela solução, causada pela agitação, o que as torna mais disponíveis para o início do processo de adsorção: a transferência externa de massa (1º passo) é acelerada resultando numa maior difusão na zona de fronteira e, consequente, aumento na eficácia de adsorção [54].

Neste trabalho, e pela metodologia envolver agitação da mistura, a adsorção das antocianinas é controlada, maioritariamente, pela estrutura do adsorvente e pelas suas propriedades químicas [54].

Tendo em conta que o processo de adsorção (das antocianinas, neste caso específico) normalmente, é constituído por três passos – transferência externa de massa, adsorção das moléculas à superfície do adsorvente e troca de posição com os elementos estruturais do interior do adsorvente (em alguns casos) ou transferência das antocianinas para a superfície interna do adsorvente poroso – e considerando o tempo que cada adsorvente levou a atingir o equilíbrio, é provável que: no caso das argilas o processo de adsorção seja imediato (não havendo distinção entre os vários passos que o constituem)

contrariamente à Lewatit e ao talco cujo processo de adsorção deve ser gradual, com cada etapa a ocorrer a seu tempo [54].

Assim, por análise de todos os parâmetros acima discutidos, da optimização do tempo de adsorção concluiu-se que as 2 horas de ensaio são suficientes para que os adsorventes atinjam o equilíbrio.

Se forem tidas em consideração as capacidades máximas de adsorção obtidas (tabela 10), para todos os adsorventes, após 2 horas de adsorção e após 5 horas de adsorção, verificamos que as capacidades são idênticas (e até ligeiramente superiores após às 2 horas, comparativamente às 5 horas).

Então, a estipulação das 2 horas como tempo de adsorção óptimo é uma decisão segura, para as condições experimentais em questão. No entanto, para as argilas, a adsorção poderia ter sido concluída aos 20 minutos.

Tabela 10 - Capacidade máxima de adsorção de cada adsorvente. Comparação entre valores obtidos ao fim de 2 horas e de 5 horas de adsorção.

Capacidade máxima de adsorção dos adsorventes (quantidade máxima de antocianina adsorvida (mg) por grama de adsorvente)						
	Estudo de cinética de adsorção (2 horas)			Estudo de adsorção (de 5 horas)		
	Faia	Amora	Uveira Açores	Faia	Amora	Uveira Açores
NaSDN3	6,50 mg/g	13,65 mg/g	17,94 mg/g	4,99 mg/g	13,02 mg/g	20,67 mg/g
SapCa-2	6,74 mg/g	14,32 mg/g	21,09 mg/g	5,47 mg/g	13,37 mg/g	22,12 mg/g
SWy-2	6,45 mg/g	14,48 mg/g	20,71 mg/g	5,36 mg/g	13,30 mg/g	22,04 mg/g
Lewatit	16,67 mg/g	36,82* mg/g	42,49 mg/g	12,63 mg/g	6,51* mg/g	51,95 mg/g
Talco	3,40 mg/g	6,08 mg/g	2,22* mg/g	2,48 mg/g	5,61 mg/g	5,69* mg/g

Conforme é ainda possível observar, na tabela 10 estão assinalados valores de capacidade de adsorção que, por serem discordantes, foi necessária uma análise mais cuidada.

No caso da resina Lewatit (com antocianina de amora adsorvida ao fim das 2 horas de adsorção), apresentou uma capacidade máxima de adsorção de cerca de 36,82 mg/g, enquanto ao fim de 5 horas tinha uma capacidade de 6,51 mg/g. Tenhamos em

consideração a tendência de adsorção verificada para todos os adsorventes: a quantidade de antocianina adsorvida a partir de extrato de faia é metade comparativamente ao extrato de amora, que por sua vez é metade em relação ao extrato de uveira dos Açores; esta tendência está relacionada com o teor total de antocianina em cada extrato. Então acredita-se que a capacidade de adsorção de 6,51 mg/g (ao fim das 5 horas) se trata de um erro experimental relacionado com a dificuldade e falta de experiência no manuseamento da resina; o valor expectável mais acertado seria, então, mais aproximado dos 36,82 mg/g obtidos ao fim das 2 horas de adsorção (valor este que corresponde a, aproximadamente, o dobro da capacidade a partir de faia e metade da capacidade a partir de uveira dos açores).

Quanto ao talco (com antocianina adsorvida a partir de extrato de uveira dos Açores), as capacidades máximas de adsorção encontram-se sinalizadas, tanto às 2 horas, como às 5 horas. Isto porque, ao compará-los, foi verificado que o valor a partir dos estudos de cinética (2,22 mg/g) é muito inferior ao valor obtido ao fim das 5 horas (5,69 mg/g). Tendo em conta o comportamento cinético do talco neste extrato (Fig.40), e tal como assinalado, foi constatado que os primeiros minutos do processo de adsorção foram oscilantes.

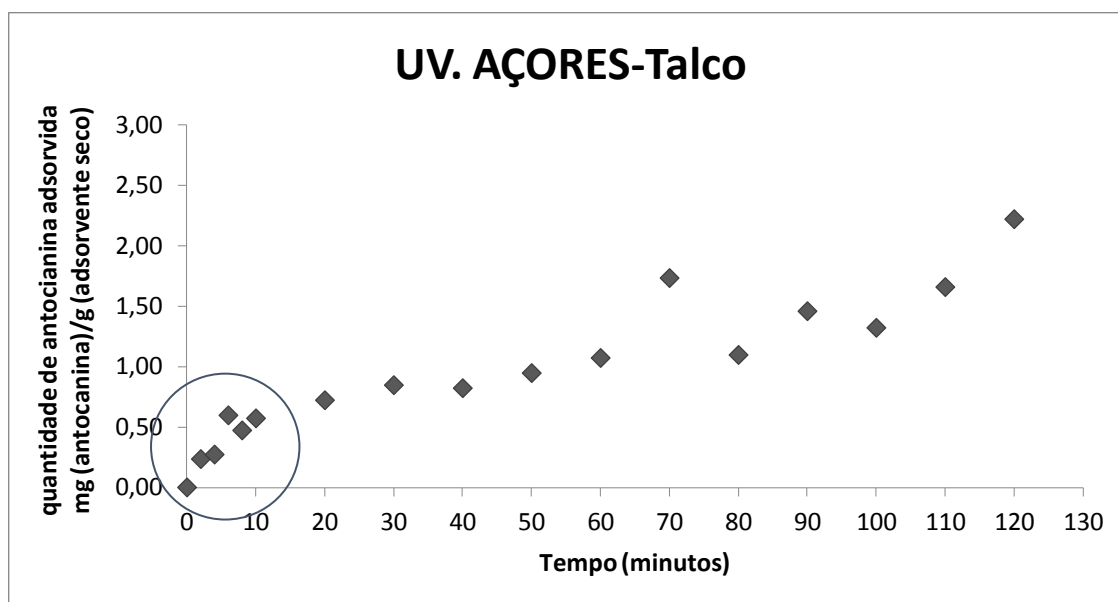


Fig. 40 - Curva de cinética de adsorção de extracto de antocianina de uveira dos Açores (5 g/L) no talco.

Este comportamento advém da heterogeneidade da mistura reaccional, agravada pelo elevado carácter hidrofóbico do talco quando colocado em contacto com a água [36]; isto influencia os primeiros momentos do processo de adsorção que são cruciais.

Daqui pode ter resultado uma adsorção incompleta, por tempo de contacto insuficiente [50], tanto nas 2 horas de cinética (adsorvendo apenas 2,22 mg/g de antocianina em contraposição às 5,69 mg/g adsorvidas em 5 horas) como nas 5 horas de adsorção (pois mesmo as 5,69 mg/g deve corresponder a uma adsorção incompleta já que seriam de esperar, aproximadamente, 10 mg/g adsorvidas, correspondentes ao dobro da antocianina adsorvida a partir de extratos de amora).

A capacidade máxima de adsorção de um adsorvente, juntamente com o comportamento do mesmo ao longo do processo de adsorção, permite avaliar as qualidades básicas de um bom adsorvente, nomeadamente: tempo necessário para que o adsorvente remova um determinado composto, bem como a eficácia com que o faz [48].

Na tabela 11, estão reunidas as capacidades de adsorção de cada um dos adsorventes, no equilíbrio, bem como o tempo que demoram a atingir o equilíbrio (em minutos).

Tabela 11 – Capacidade de adsorção dos diferentes adsorventes, no equilíbrio, e tempo necessário para que atinjam o equilíbrio.

	Quantidade de antocianina adsorvida no equilíbrio (mg antocianina/ g adsorvente)			Tempo necessário para atingir o equilíbrio (min ⁻¹)
	Faia	Amora	Uv. Açores	
NaSDN₃	6,50 mg/g	13,65 mg/g	17,94 mg/g	20
SapCa-2	6,74 mg/g	14,32 mg/g	21,09 mg/g	20
SWy-2	6,45 mg/g	14,48 mg/g	20,71 mg/g	20
Lewatit	16,67 mg/g	36,82 mg/g	42,49 mg/g	60
Talco	3,40 mg/g	6,08 mg/g	5,69 mg/g	120

Se tivermos em conta as capacidades de adsorção, verificamos que os adsorventes, por ordem crescente de eficácia, seguem a tendência: Talco < NaSDN₃ < SWy-2 < SapCa-2 < Lewatit.

Se, por outro lado, analisarmos o tempo necessário que cada adsorvente necessita para que seja atingido o equilíbrio (por ordem crescente de tempo), verificamos a tendência: argilas < Lewatit < talco.

Então, facilmente concluímos que a resina Lewatit adsorve uma maior quantidade de antocianina (por grama de adsorvente seco), mas também é dos adsorventes que necessita mais tempo para atingir o equilíbrio. Contudo, e uma vez que a quantidade de antocianina adsorvida é de, aproximadamente, o dobro, comparativamente aos restantes

adsorventes, foi entendido que o tempo dispendido para que atinja o equilíbrio (e consequentemente os custos implícitos a uma possível aplicação industrial) são justificáveis.

Já as argilas, apesar de adsorverem, aproximadamente, metade da quantidade de antocianina comparativamente à resina Lewatit, levam menos de metade do tempo a atingir o equilíbrio (20 minutos, em contraposição a 60 minutos). Todavia, a utilização de argilas, em detrimento das resinas sintéticas, traduz-se na valorização de recursos naturais; entende-se, assim, que apesar de adsorver menos quantidade, a utilização das argilas é mais vantajosa em relação às resinas sintéticas.

Quanto ao talco, claramente é o adsorvente menos eficaz na adsorção de antocianinas pois, não só é o que adsorve menos quantidade, como é o que demora mais tempo a atingir o equilíbrio (situação por vezes nem verificada).

1.4. Conclusões

No que diz respeito ao método de extracção utilizado, concluiu-se que conduz a amostras com grandes quantidades de compostos que não os de interesse, por não ser um método selectivo para as antocianinas. Concluiu-se, assim, ser necessário a adição de um passo adicional que aumentasse a selectividade do método de extracção para os compostos de interesse, nomeadamente a purificação do extrato por partição com acetato de etilo.

Quanto à partição com acetato de etilo, revelou-se ineficaz; então concluiu-se que, preferencialmente, a extracção de antocianinas a partir das fontes vegetais deveria sido repetida, sem a partição com acetato de etilo, o que não foi possível por falta de material vegetal de partida.

Relativamente à optimização dos parâmetros de adsorção, concluiu-se que, de acordo com os objectivos do trabalho, o pH ideal a ser utilizado ronda os valores 4 - 4,5, sendo a proporção massa de adsorvente/volume de solução de extrato de 10 mg/ml.

Quanto ao método de quantificação de antocianina, em solução de extrato e adsorvida, nomeadamente por espectrofotometria UV-vis, concluiu-se ser adequado, tendo em conta a natureza complexa das matrizes em estudo. Também foi possível concluir que, nas condições experimentais aplicadas, as antocianinas apresentaram uma absorção máxima no comprimento de onda dos 517 nm e, portanto, este foi o

comprimento de onda selecionado para a quantificação das mesmas ao longo de todo o trabalho.

No que concerne ao parâmetro da concentração da solução de extrato de antocianina, concluiu-se que, de entre as três concentrações testadas, a concentração 5 g/L revelou-se a mais adequada, por uma questão de poupança de extrato.

Quanto à capacidade de adsorção dos adsorventes, foi possível concluir que é influenciada pela concentração da solução de extrato de antocianina, como também pela complexidade do próprio extrato. De acordo com as capacidades de adsorção, foi ainda possível agrupar os adsorventes em 2 grupos distintos; os materiais laminares que dizem respeito às argilas, e os materiais não-laminares nos quais se incluem o talco e a resina Lewatit. Uma vez que os extractos de uveira dos Açores e uveira da Madeira originam quantidades de antocianinas adsorvidas idênticas, e devido à escassez de material vegetal de uveira da Madeira, determinou-se que apenas seria utilizada a uveira dos Açores para o restante trabalho.

Quanto aos possíveis mecanismos de adsorção envolvidos no processo de adsorção de antocianinas aos materiais laminares e não-laminares, por falta de técnicas mais adequadas, em nenhum dos grupos foi possível tirar conclusões. Pelo mesmo motivo, também não foi possível concluir acerca da localização exata das antocianinas (à superfície ou no interior); fica assim justificada a hesitação na designação das antocianinas como adsorvidas/imobilizadas pois não foi possível apurar, ao certo, se estão retidas, no interior dos poros ou galerias do sólido, ou apenas imobilizadas à superfície.

Da optimização do tempo de adsorção, concluiu-se que a capacidade de adsorção dos adsorventes é proporcional ao tempo durante o qual ocorre o processo. Também foi possível concluir que 2 horas de ensaio são suficientes para que os adsorventes atinjam o equilíbrio. Adicionalmente foi possível concluir que os materiais laminares (argilas) são os mais rápidos a atingir o equilíbrio, aos 20 minutos de ensaio, e a capacidade máxima de adsorção varia de acordo com o extrato. Já os materiais não-laminares demoram mais tempo a atingir o equilíbrio: por um lado, a Lewatit demora cerca de 60 minutos mas apresenta a maior capacidade de todos os adsorventes, por outro lado o talco revelou-se o pior adsorvente e de difícil manipulação.

2. Avaliação da estabilidade de antocianinas imobilizadas em matrizes sólidas – determinação da actividade antioxidante (DPPH)

2.1. Objectivo

O objectivo principal da determinação da actividade antioxidante das antocianinas imobilizadas nas matrizes sólidas em estudo foi verificar se os pigmentos se mantêm estáveis ao longo do tempo, e consequentemente, mantêm a sua actividade antioxidante.

2.2. Metodologia

2.2.1. Preparação das matrizes sólidas carregadas com antocianinas

As matrizes sólidas carregadas – materiais laminares e não-laminares com antocianinas imobilizadas - foram preparadas conforme a metodologia de adsorção previamente otimizada e esquematizada na Fig.41.

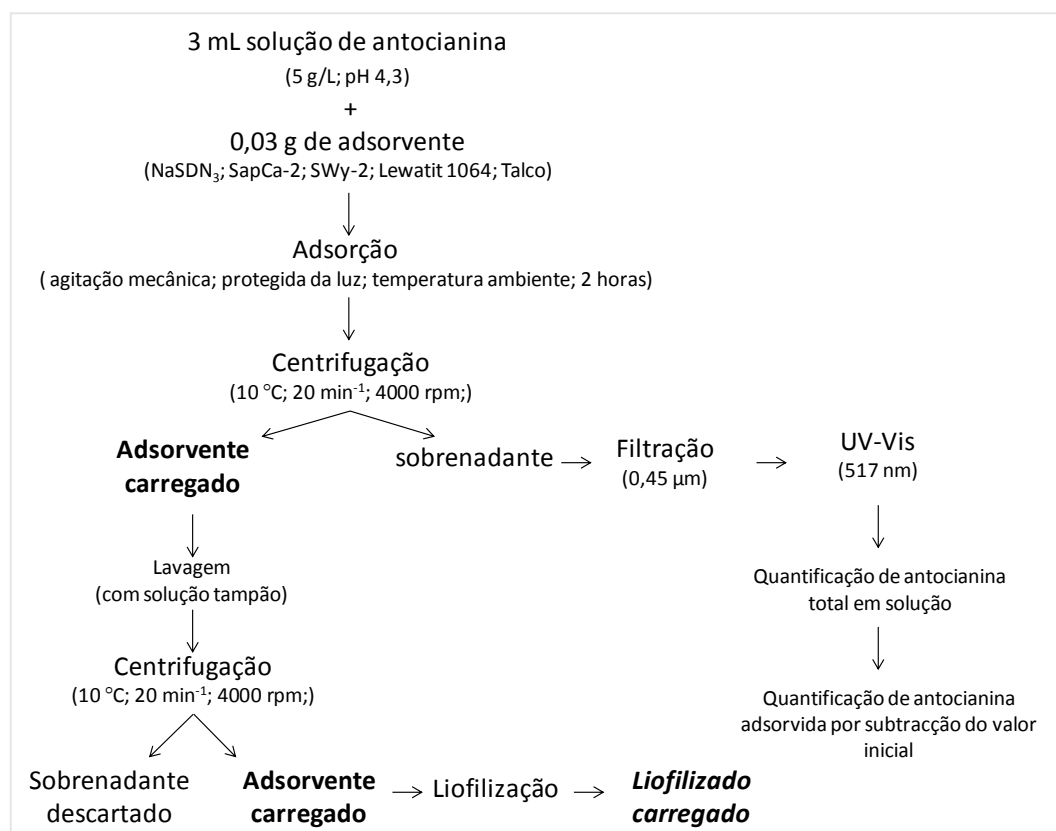


Fig. 41 - Metodologia aplicada para preparação das matrizes sólidas.

Os cinco adsorventes estudados - argilas: NaSDN₃, SapCa-2 e SWy-2; resina Lewatit VP 1064 MD PH e talco farmacêutico – foram, assim, preparados para cada uma das fontes de antocianinas selecionadas – faia, amora e uveira dos Açores. Daqui resultaram três lotes de cinco matrizes carregadas, conforme esquematizado na Fig.42.

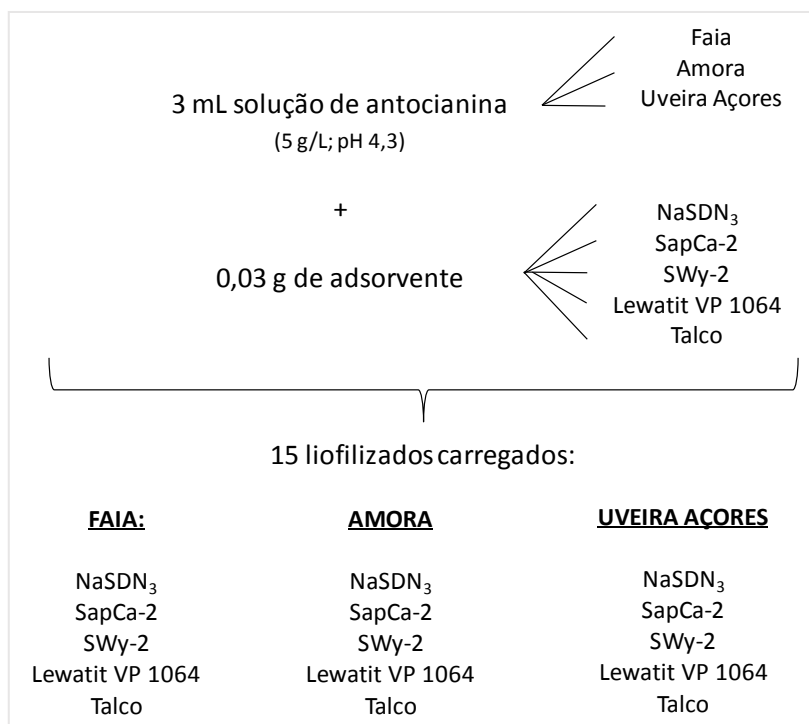


Fig. 42 - Esquematização dos lotes de matrizes obtidos para o estudo.

A quantidade de antocianina imobilizada em cada adsorvente foi quantificada, conforme a metodologia de quantificação otimizada anteriormente (espectrofotometria UV-Vis a 517 nm). Na tabela 12 encontram-se os resultados obtidos.

Tabela 12 - Quantidade de antocianina adsorvida (miligrama de antocianina por grama de adsorvente) nos adsorventes carregados.

	Faia	Amora	Uv. Açores
NaSDN3	5,74 ± 1,06	13,33 ± 0,44	19,30 ± 1,93
SapCa-2	6,10 ± 0,89	13,84 ± 0,67	21,60 ± 0,72
SWy-2	5,95 ± 0,77	13,89 ± 0,83	21,37 ± 0,94
Lewatit	14,64 ± 2,84	33,46 ± 4,74	47,22 ± 6,68
Talco	2,94 ± 0,65	5,84 ± 0,33	11,45 ± 1,08

2.2.2. Determinação da actividade antioxidante das matrizes preparadas

Os adsorventes carregados e liofilizados foram submetidos a um teste de capacidade antioxidante (DPPH), segundo a metodologia de Gordon *et al.* [55]. Foram introduzidas algumas modificações - representado na Fig.43 - visto o DPPH ser colocado em contacto com um sólido (e não com um líquido), tal como realizado por Teixeira-Neto *et al.* [21].

Assim, a 0,001 g de adsorvente carregado, foram adicionados 3,5 mL de uma solução de DPPH (0,06 mM em metanol), sendo a mistura reaccional colocada em agitação mecânica (*orbital shaker*, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz) por 30 minutos. Ao fim deste tempo, a mistura foi centrifugada, o adsorvente foi separado do sobrenadante, sendo o primeiro descartado e o sobrenadante filtrado (0,45 μ m) e analisado por espectrofotometria UV-Vis a 516 nm.

Esta metodologia foi aplicada, em triplicado, a todos os lotes das matrizes preparadas anteriormente.

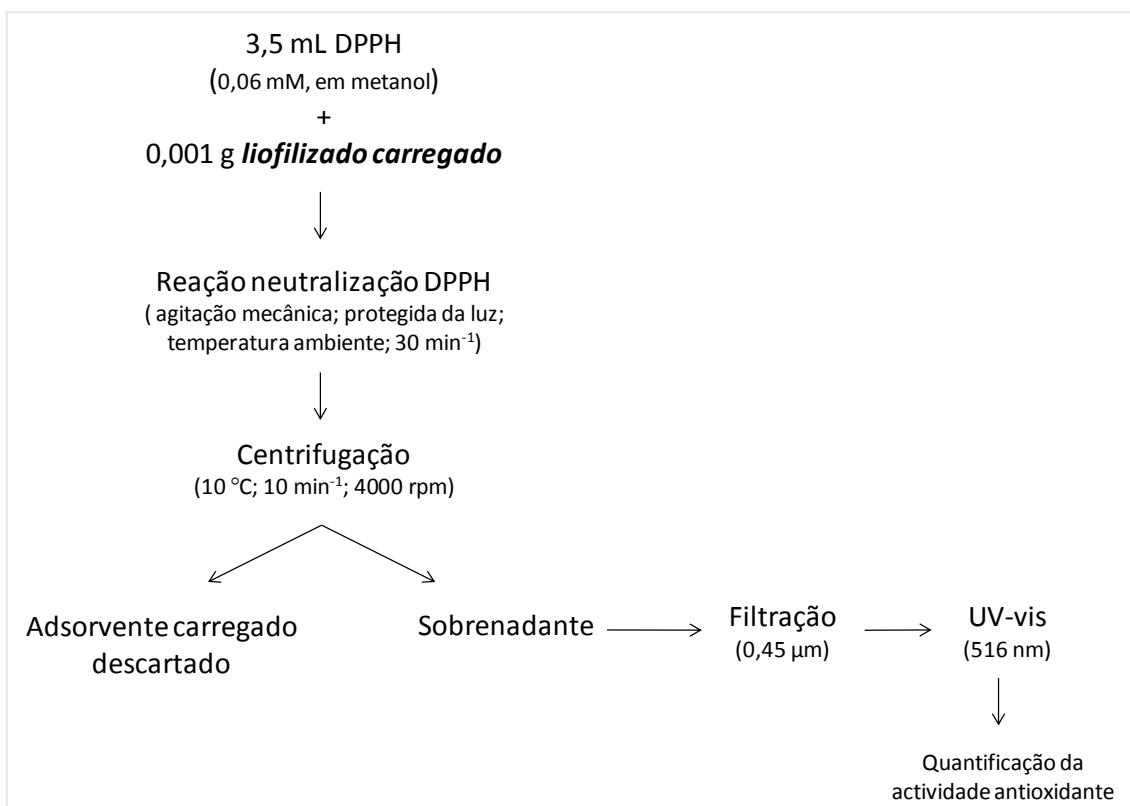


Fig. 43 - Metodologia aplicada para determinação da actividade antioxidante das antocianinas imobilizadas nas matrizes sólidas em estudo.

A actividade antioxidante foi determinada com recurso a uma recta de calibração, previamente traçada, por análise do produto da adição de diversas soluções de Trolox (0,2 – 1,2 μ m) a 3,5 mL de solução de DPPH (0,06 mM), após 30 minutos de reacção.

A partir da recta (Fig.44), com equação $y = -0,5014x + 0,489$ e coeficiente (R^2) igual a 0,984, determinou-se a actividade antioxidante dos sólidos em estudo, estando os resultados expressos em mili molar de equivalentes de Trolox por grama de adsorvente seco.

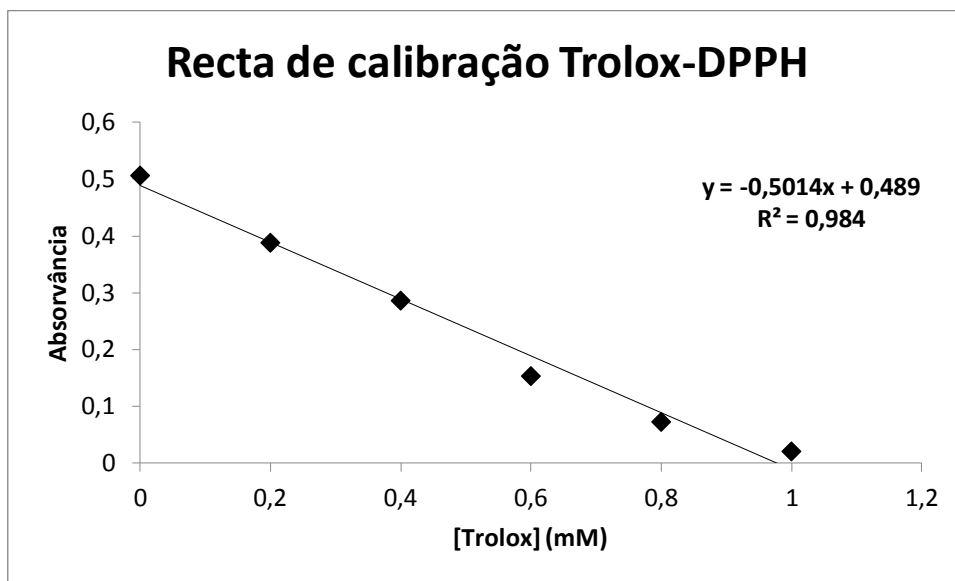


Fig. 44 - Recta de calibração Trolox-DPPH.

Esta primeira determinação de actividade antioxidante foi definida como o ponto de partida dos ensaios de actividade antioxidante das matrizes ao longo do tempo. De uma forma mais simples: foi definida como a *semana 0 (zero)* do estudo.

As matrizes foram então armazenadas durante 8 semanas, a 4 °C, ao abrigo da luz (conforme esquematizado na Fig.45).

2.2.3. Estudo de estabilização das antocianinas imobilizadas em matrizes sólidas – monitorização de actividade antioxidante ao longo do tempo

Após as 8 semanas de armazenamento, foi realizada uma nova determinação de actividade antioxidante de todas as matrizes (denominada *semana 8*).

Foi iniciado, simultaneamente, o estudo da estabilização das antocianinas imobilizadas nas matrizes, ao longo do tempo, quando submetidas a condições consideradas extremas. Para o efeito, as matrizes foram divididas em 2 lotes distintos:

expostas à radiação solar (à temperatura ambiente) e expostas a temperaturas elevadas (50 °C, ao abrigo da luz) (Fig.45). Desta forma a mesma matriz é estudada em condições diferentes.

Após uma semana da divisão (*semana 9*), foi realizada nova determinação da actividade antioxidante das matrizes. O mesmo procedimento foi realizado todas as semanas, em triplicados, e conforme representado na Fig.45.

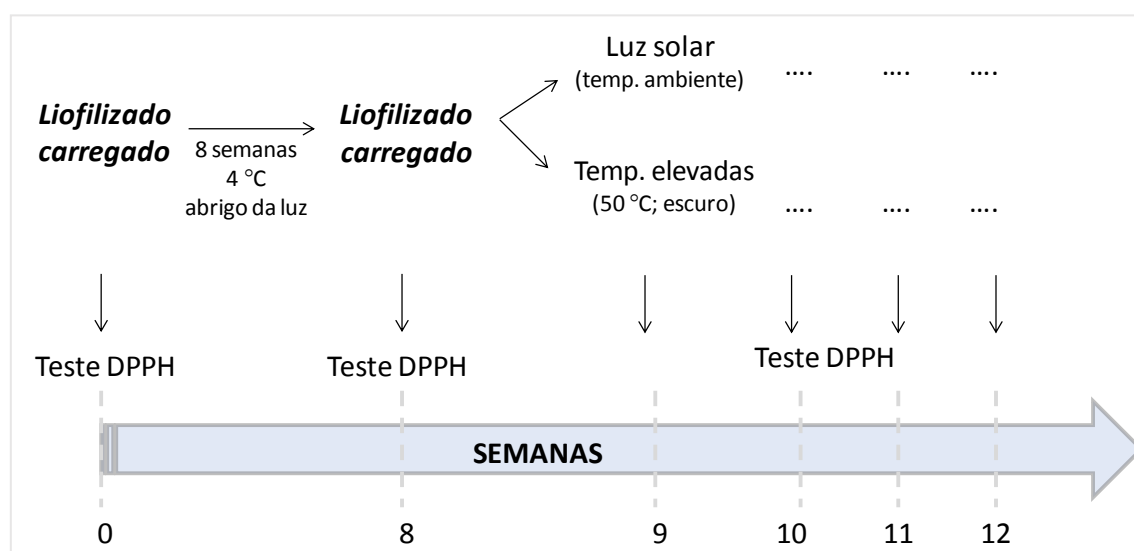


Fig. 45 – Esquemática da metodologia aplicada no estudo da estabilização das antocianinas imobilizadas nas matrizes sólidas em estudo.

2.3. Resultados e discussão

O ensaio de DPPH é um dos testes utilizados para avaliação das propriedades antioxidantes de compostos e/ou misturas complexas, de que são exemplo os extratos naturais [27].

Este método consiste na dissolução de cristais de DPPH em álcool (metanol neste caso), no qual é adicionado uma alíquota de antioxidante; a mistura é incubada por, cerca de 30 minutos e a absorvância final lida [27]. Ao longo da reacção é verificada uma alteração de cor: a solução inicial (púrpura) dá lugar a uma solução final (amarela) que se deve à redução do DPPH· a DPPH₂ por transferência do átomo de H do antioxidante [16,27] .

Por ser um ensaio simples e de baixo custo, este teste foi selecionado como adequado para a avaliação da actividade antioxidante das matrizes do presente trabalho, seguindo o procedimento experimental de Teixeira-Neto *et al.* [21].

De acordo com a metodologia aplicada, os ensaios de DPPH podem ser de natureza estática ou dinâmica [27]. A metodologia aplicada no presente trabalho é classificada como estática pois quantifica o radical cromogénico consumido, após reacção com a amostra antioxidante, após um período de tempo previamente determinado (30 minutos) [27].

A metodologia aplicada, por ser estática, constitui uma desvantagem já que subestima a actividade dos antioxidantes de acção lenta para descolorar o DPPH [27].

Por aplicação da metodologia descrita nas matrizes sólidas com antocianinas imobilizadas, foi verificada a necessidade de homogeneizar as amostras, por agitação mecânica, durante os 30 minutos de incubação.

Os resultados obtidos estão na Tabela A4 (*ver anexos*), e são expressos em milimolar de equivalentes de trolox (por grama de adsorvente seco), porque têm em consideração a descoloração originada pelo composto de referência trolox [27].

Análise dos sobrenadantes e das matrizes sólidas após reacção de neutralização

As matrizes sólidas também foram analisadas após a reacção de neutralização: foi observado que os materiais laminares (argilas) mantinham a coloração vermelha conferida pelas antocianinas imobilizadas nas suas estruturas, contrariamente aos materiais não laminares (resina Lewatit e talco) que passaram a incolores.

Interpretação das evidências visuais

Para uma correcta interpretação dos resultados obtidos, é importante ter em consideração que a intensidade da coloração dos sobrenadantes (após a reacção de neutralização) está directamente relacionada com o conteúdo de antioxidantes presente na amostra [9]. Adicionalmente, os resultados têm de ser discutidos com base na coloração do sobrenadante, em simultâneo com as matrizes sólidas (visto que são estas que contêm os antioxidantes imobilizados).

Por uma questão de simplificação na interpretação e discussão dos resultados, será feita distinção entre os materiais laminares e os materiais não-laminares.

Nos materiais laminares, não se verificou a descoloração do DPPH que continuou púrpura; foi assim possível concluir que não há actividade antioxidante indicando que antocianinas não estavam disponíveis para reagir por se encontrarem adsorvidas à matriz sólida. As evidências podem indicar duas hipóteses: ou o conteúdo de

antioxidante imobilizado nas matrizes é demasiado baixo e, portanto, insuficiente para neutralizar todo o radical presente ou, por outro lado, o tempo de incubação não é suficiente para que o antioxidante neutralize na totalidade o radical presente.

Os materiais não-laminares – Lewatit e talco – apresentaram um comportamento distinto dos materiais laminares. No talco foi verificada a descoloração do DPPH o que poderá indicar uma fraca interacção entre as antocianinas e a estrutura do talco; o resultado é a dessorção das antocianinas que ficaram disponíveis em solução para descolorar o DPPH. Quanto à Lewatit, a descoloração do DPPH indicou que há actividade antioxidante que é acompanhada pela degradação das antocianinas: ou nas condições de trabalho (pH e meio metanólico) as antocianinas saem do poro para a solução onde reagem com o DPPH e perdem a cor, ou as antocianinas permanecem no interior do poro mas tem a capacidade de reagir com o DPPH. Não foi possível concluir sobre nenhuma das hipóteses.

Tanto para os materiais laminares como para os materiais não-laminares, e na tentativa de chegar a alguma conclusão, procedeu-se à análise dos valores de actividade antioxidante obtidos (em milimolar de equivalentes de trolox).

Análise e interpretação dos valores de actividade antioxidante obtidos

Os resultados obtidos, como mencionado anteriormente, encontram-se na Tabela A4 (*ver anexos*), estão expressos em milimolar de equivalentes de trolox (por gama de adsorvente seco) pois têm em consideração a descoloração originada pelo composto de referência trolox [27].

Da análise dos resultados obtidos, foram verificadas oscilações e discrepâncias que não estavam previstas. Assim, por uma questão de simplificação, os resultados serão discutidos tendo por principal base as matrizes carregadas com antocianinas da faia (lote exposto à radiação solar), já que o comportamento observado para esta matriz (tabela13) foi o mais próximo do aceitável, comparativamente às restantes amostras.

Tabela 13 – Actividade antioxidante das matrizes adsorvidas com antocianinas de faia, após exposição solar por 4 semanas. Resultados expressos em milimolar de equivalentes de trolox por grama de adsorvente.

		Actividade antioxidante das matrizes carregadas com antocianinas da faia, expostas à radiação solar (eq. trolox /massa adsorvente (mM/g))					
		Semana 0	Semana 8	Semana 9	Semana 10	Semana 11	Semana 12
Faia	NaSDN ₃	438,81	416,25	210,16	145,38	88,71	229,43
	SapCa-2	557,98	284,14	285,92	290,51	249,36	368,74
	SWy-2	473,59	434,10	200,65	325,17	175,21	378,99
	Lewatit	1276,48	663,05	550,05	605,61	513,21	495,73
	Talco	219,46	155,85	65,53	231,99	-28,14	92,96

Por comportamento aceitável - tendo em conta o principal objectivo do trabalho e o fundamento do próprio teste - entendam-se apenas duas situações: ou a manutenção da actividade antioxidante ao longo das semanas (significando que as antocianinas se encontram estáveis imobilizadas nas matrizes sólidas) ou decréscimo da actividade antioxidante ao longo das semanas (cujo significado é o de que não é possível estabilizar antocianinas por imobilização em matrizes sólidas quando expostas a condições adversas de radiação ou temperatura) [27]. Nenhum resultado que indique o aumento da actividade antioxidante foi aceite como válido pois em momento algum houve adição de conteúdo de antocianinas.

Por análise da actividade antioxidante dos adsorventes carregados com antocianinas de faia após o processo de adsorção (*semana 0*), verificou-se que a maior actividade antioxidante expressa dizia respeito à resina sintética Lewatit (cerca de 1276,48 mM/g) seguindo-se os restantes adsorventes com a tendência: SapCa-2 > SWy-2 > NaSDN₃ > talco.

No caso específico da Lewatit (material não laminar), e relacionando as evidências visuais (sobrenadante amarelo e resina incolor) com a actividade antioxidante apresentada (maior actividade comparativamente a todos os outros adsorventes), concluiu-se que, de facto, nesta matriz as antocianinas estão mais disponíveis para reagir com o DPPH e neutraliza-lo. Isto se deve ao solvente utilizado para realização do ensaio; o metanol, por se tratar de um álcool, e tal como descrito, corresponde a um dos solventes preferenciais a ser utilizados em resinas macroporosas quando se pretende a dessorção do composto adsorvido [26]. Assim, durante o ensaio,

pode ter sido promovida a dessorção/mobilização das antocianinas da matriz sólida para a solução reaccional, tornando-a totalmente disponível para neutralizar o radical; o resultado é a expressão de uma maior actividade antioxidante, comparativamente aos outros adsorventes em estudo.

Após 2 meses de armazenamento a 4°C (*semana 8*), é possível observar que a actividade antioxidante das amostras baixou em, aproximadamente, 50% na argila SapCa-2 e na resina Lewatit; já as argilas NaSDN₃ e SWy-2 apresentaram uma perda menos significativa (5% e 8%, respectivamente), sendo o talco o adsorvente que apresentou uma perda intermédia a todos os referidos, com cerca de 28%. Isto indica que a argila SapCa-2 e a resina Lewatit não deverão ser bons estabilizadores de antocianinas em condições de armazenamento a temperaturas baixas, resultando na perda de conteúdo de antocianinas e, portanto, na diminuição da actividade antioxidante da amostra. Já as argilas NaSDN₃ e SWy-2 poderão ser bons estabilizadores nas mesmas condições, com perdas de actividade antioxidante muito pequenas, que é o mesmo que afirmar que o conteúdo de antocianinas perdido é muito pequeno. O talco poderá ser um estabilizador intermédio, com perdas de actividade antioxidante a rondar os 28%.

À primeira vista, os resultados acima discutidos, nomeadamente da *semana 0* e *semana 8*, poderiam ser considerados válidos. Mas, após verificar os resultados obtidos ao longo do estudo de estabilização das antocianinas adsorvidas (durante 4 semanas em condições extremas), foi concluído que os valores obtidos nos ensaios de DPPH para as matrizes em estudo não poderiam ser considerados válidos.

Esta decisão teve por base os valores de actividade antioxidante recolhidos ao longo do ensaio, para todas as amostras (*ver anexo*, Fig. A8, Fig. A9, Fig. A10, Fig. A11 e Fig. A12); foram verificadas muitas oscilações de valores, e inclusivamente situações de aumento de actividade antioxidante.

No caso específico das matrizes carregadas com antocianinas da faia, expostas à radiação solar, as referidas variações são observáveis na Fig.46: no caso da argila NaSDN₃, verificamos que há uma perda gradual de actividade antioxidante, da *semana 0* à *semana 11* (438,81 mM/g, 416,25 mM/g, 210,16 mM/g, 145,38 mM/g e 88,71 mM/g); mas da *semana 11* para a *semana 12* foi observado um ganho significativo de actividade antioxidante, passando de 88,71 mM/g para 229,43 mM/g; outro exemplo é o do talco para o qual foi verificado um aumento de actividade antioxidante, da *semana 9* para a *semana 10* (65,53 mM/g em contraposição a 231,99 mM/g), tendo diminuído na

semana 11 para -28,14 mM/g (valor nem considerado válido), de seguida aumentando para 92,96 mM/g na semana 12.

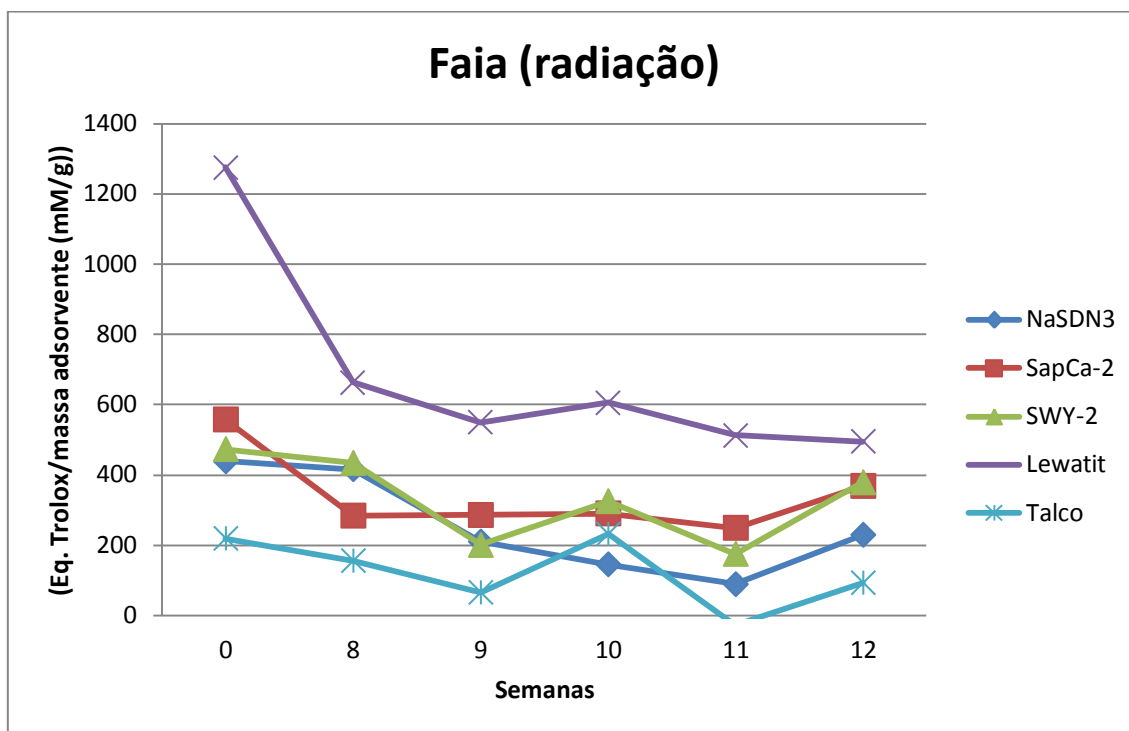


Fig. 46 - Variação da actividade antioxidante das matrizes adsorvidas com antocianinas da faia, ao longo das 4 semanas de exposição solar.

Também Teixeira-Neto et al. [21] nos seus ensaios de actividade antioxidante de antocianinas imobilizadas em argilas reportou diferenças no comportamento cinético da reacção de neutralização do DPPH. Uma vez que ambos os trabalhos têm em comum as matrizes em estudo – antocianinas adsorvidas em argilas – a explicação dada pelo autor foi adotada como válida para os resultados obtidos neste estudo.

Contrariamente à maioria das metodologias aplicadas nos ensaios de DPPH - nas quais os antioxidantes se encontram em solução com o radical - no presente trabalho o antioxidante está imobilizado numa matriz sólida. Assim, mesmo colocando a matriz em contacto com a solução de DPPH, é expectável uma acrescida dificuldade ao nível do acesso ao radical, por parte do antioxidante, condição obrigatória para que a reacção ocorra. Para além disto, estão ainda envolvidos diversos factores que influenciam a reacção de neutralização do DPPH pelo antioxidante, nomeadamente: a difusão intra partículas das moléculas de DPPH, a capacidade de expansão das argilas em solução alcoólica, a natureza dos iões catiões das lâminas das argilas e ainda a área de superfície das matrizes (argilas com antocianinas) [21].

Fica assim explicada a inconsistência dos resultados obtidos ao longo do estudo. Posto isto, os resultados obtidos por aplicação desta metodologia não podem ser considerados válidos nem a metodologia é reprodutível, pelo menos nas condições de trabalho em questão.

Pelos mesmos motivos, apenas os resultados obtidos para a resina sintética Lewatit poderiam, eventualmente, ser tidos em consideração, uma vez que, tal como já referido, a solução metanólica promove a dessorção das antocianinas, que passam a estar disponíveis em solução, juntamente com o DPPH; desta forma não seria colocada em questão a limitação referida.

Nem estes resultados podem ser considerados válidos pois em alguns casos foram observadas discrepâncias (mesmo entre triplicados da resina Lewatit): enquanto em alguns ensaios era promovida a dessorção total das antocianinas, confirmada pela coloração da resina que passava de avermelhada a branca após os 30 minutos de ensaio, noutras situações, mesmo após o tempo de incubação ocorrido, a resina ainda apresentava alguma coloração vermelha, indicando que ainda restava algum teor de antocianinas adsorvidas.

2.4. Conclusões

Foi assim possível concluir que a metodologia do DPPH, por ser simples e barata, e tal como referenciada por muitos autores, é um dos testes úteis para a avaliação das propriedades antioxidantes de compostos e de misturas complexas, como extratos naturais. A metodologia aplicada no trabalho é classificada como estática pois quantifica o radical consumido após reacção com o agente antioxidante, num determinado período de tempo.

A principal conclusão em relação à aplicação desta metodologia para avaliação da actividade antioxidante das matrizes sólidas com antocianinas imobilizadas foi a de que o ensaio de DPPH não é eficaz nas condições de trabalho: não só pelas próprias limitações do método, mas também pela limitação adicional das antocianinas estarem imobilizadas em estruturas sólidas e não em solução com o DPPH.

3. Avaliação da estabilidade das antocianinas imobilizadas em matrizes sólidas – Análise colorimétrica (CIELAB)

3.1. Objectivo

O objectivo do estudo colorimétrico das matrizes sólidas com antocianinas imobilizadas foi analisar as variações de cor ao longo do tempo de exposição a condições extremas – radiação solar incidente e temperatura elevada – avaliando, assim, indirectamente, a estabilidade dos compostos imobilizados.

3.2. Exposição das matrizes sólidas a condições extremas de temperatura e exposição solar

As matrizes sólidas utilizadas foram as mesmas matrizes preparadas para os testes de capacidade antioxidante (DPPH).

A metodologia aplicada na exposição das amostras a condições extremas de radiação solar incidente e temperatura elevada foi a mesma, conforme exemplificado na Fig.47.

As matrizes estiveram expostas às condições extremas, por um período de 8 semanas, ao fim das quais foram realizadas as leituras colorimétricas para comparação de cor entre as amostras e os respectivos padrões (matrizes sólidas carregadas com antocianinas logo após a adsorção).

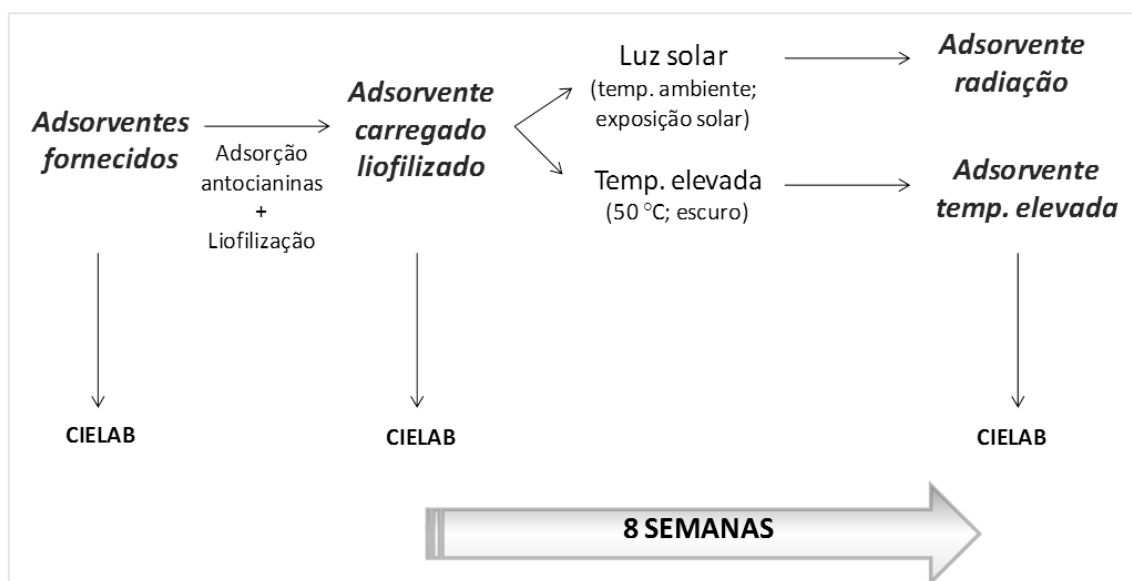


Fig. 47 – Esquemática da metodologia aplicada na determinação da cor das matrizes em estudo (CIELAB).

3.3. Análise de cor das matrizes sólidas

As matrizes sólidas em estudo foram analisadas por colorimetria CIELAB. Para o efeito, foram dispostas sobre lâminas de vidro e ligeiramente prensadas com lamelas, a fim de criar uma área de superfície plana e suficientemente ampla para a leitura colorimétrica.

A análise colorimétrica foi realizada com recurso a um colorímetro CR-300 da Konica Minolta que mediu os parâmetros colorimétricos L^* , a^* e b^* (também denominadas de coordenadas CIELAB) de todas as matrizes sólidas.

Os resultados foram analisados, tal como obtidos, e discutidos por comparação directa de parâmetros $L^*a^*b^*$ entre as amostras (matrizes sólidas carregadas com antocianinas após submetidas a condições extremas) e os padrões.

3.4. Resultados e discussão

Com a crescente preocupação da ingestão de corantes artificiais, e consequente legislação e actividades regulatórias, o expectável é que a sua substituição seja cada vez mais frequente, nos tempos mais próximos. De entre os corantes naturais substitutos dos corantes artificiais, as antocianinas representam um dos componentes de preferência: a mesma molécula tem a capacidade de atribuir diferentes tonalidades de cor - resultado das diversas formas que pode assumir - característica importante para que o produto final apresente a cor pretendida [56].

Contudo, quando comparados aos corantes artificiais, as antocianinas são extremamente sensíveis a condições químicas e ambientais. Daí que o desenvolvimento de produtos que contenham extratos naturais de antocianinas represente um verdadeiro desafio [56].

As alterações de cor permitem monitorizar a evolução de pigmentos e de antocianinas; para isso é fundamental efectuar medições precisas dos parâmetros de cor [57].

A estabilidade das antocianinas, mais precisamente a estabilidade da cor conferida pelas mesmas, particularmente quando submetidas a diferentes condições de armazenamento, é temática de estudo de diversos laboratórios. Mas a comparação dos resultados obtidos entre eles é uma tarefa difícil, não só pela própria complexidade do tema, mas também pelas inúmeras formas como os resultados podem ser apresentados: que variam desde percentagem de antocianinas restante/perdida, a valores de UV-vis,

passando por apresentação de valores CIELAB ou até comparações fotográficas de amostras [56].

Actualmente, de entre os métodos disponíveis para a medição da cor de superfícies de frutos e flores, a escala de cor CIELAB é o método colorimétrico mais utilizado em diversas indústrias para avaliação da qualidade da cor [58,59]. Este método é vantajoso na medida em que, por ser uma escala padrão, permite a comparação objectiva e directa de cores [58–60].

A aplicação de sistemas colorimétricos, tal como o CIELAB, está descrita como uma mais-valia na quantificação e caracterização de propriedades de cor, não só de pigmentos (em flores e bagas), como também de bens alimentares, entre outros [59,61].

Para além dos motivos já referidos, e tal como descrito por West *et al.* [56], o método colorimétrico CIELAB foi o selecionado como o mais adequado para o estudo da estabilidade da cor conferida pelas antocianinas, em diferentes condições de armazenamento, ao longo do tempo.

Para que a interpretação dos resultados seja a mais correcta, é fundamental um breve enquadramento e elucidação acerca do método e do seu fundamento.

CIELAB – Enquadramento e elucidação do fundamento do método

De acordo com a CIE (*Comission Internationale de L'Eclairage*) – organização cujo trabalho se baseia no uso da luz e cor – o olho humano possui três receptores de cor, vermelho, verde e azul, respectivamente, sendo as restantes cores o resultado da combinação destas três [56,57].

Adicionalmente, para que haja percepção da cor é fundamental que haja luz – energia electromagnética perceptível ao olho humano, correspondente à faixa do espectro electromagnético com comprimentos de onda entre 360-700 nm [60].

Para além destes dois factos, a cor dos objectos é influenciada pela presença de agregados poliméricos/moleculares específicos, naturais ou sintéticos, conhecidos como pigmentos ou corantes [12].

Uma vez que a cor não é uma característica inerente dos objectos mas antes uma percepção subjectiva condicionada à existência da luz e da percepção pelo olho, é necessário recorrer a um sistema que proceda à uniformização da cor [60].

A CIE desenvolveu e recomendou, em 1976, um método para medição cromática onde as cores podem ser descritas numericamente, numa escala de cor uniforme e

objectiva que permite uma fácil comparação entre os valores de cor. Neste método é utilizado um dispositivo de medição, vulgarmente conhecido por colorímetro [56,58].

O colorímetro utilizado no presente trabalho (Fig.48) foi o CR-300 da Konica Minolta, que é constituído por uma cabeça de medição e o respectivo processador de dados DP-301, e consiste num colorímetro triestímulo pois mede três parâmetros de cor, através da quantificação da luz incidente e reflectida que ilumina a superfície da amostra [62].



Fig. 48 – Colorímetro utilizado nos ensaios colorimétricos: colorímetro CR-300 da Konica Minolta.

O sistema CIELAB ou CIE $L^*a^*b^*$, representado na Fig.49, consiste num espaço de cor tridimensional (três eixos perpendiculares entre si) organizado num cubo, que define a cor por meio de três coordenadas/parâmetros [56,57,59,60].

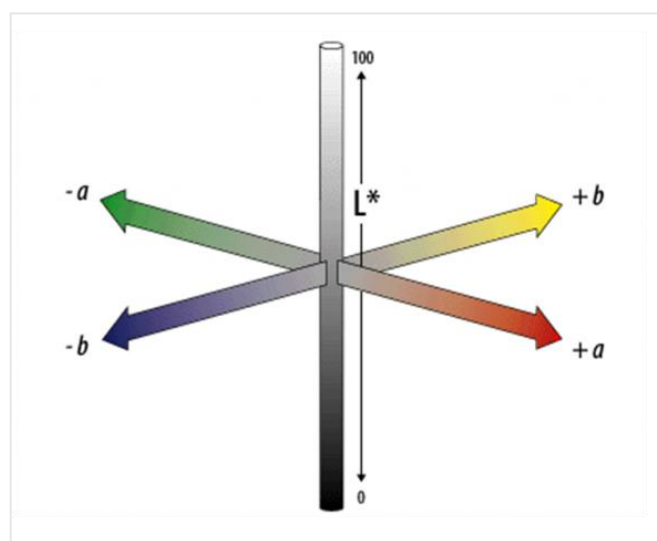


Fig. 49 - Representação do espaço de cor CIELAB e respectivos eixos. Adaptado de: [60]

- L^* → eixo vertical que define a luminosidade do objecto, que varia entre o opaco/preto ($L^* = 0$) e o translúcido/branco ($L^* = 100$) [56,57,59,60];
- a^* → eixo horizontal que define as cores complementares vermelho (a^* positivo) e verde (a^* negativo). Os valores desta coordenada variam entre -90 a +70 [56,57,59,60];
- b^* → eixo horizontal que define as cores complementares amarelo (b^* positivo) e azul (b^* negativo), com valores a variar entre -80 a +100. [56,57,59,60];

As coordenadas $L^*a^*b^*$ também podem ser referidas como valor, croma e matiz, respectivamente. O valor (L^*) determina a luminosidade de uma cor, ou, por outro lado, a quantidade de cinza que esta contém; o croma (a^*) determina o grau de saturação de uma cor; a matiz (b^*) diz respeito à característica que permite o observador distinguir uma determinada cor dentro de diferentes famílias de cor [60].

Para que seja possível determinar uma cor específica, e perceber a influência de cada um dos parâmetros de cor na mesma, é fundamental analisar todas as coordenadas individualmente. Assim temos que [60] :

- $a^* > 0$ → avermelhados;
- $a^* < 0$ → esverdeados;
- $a^* \approx 0$ → cores neutras (cinzas e brancos);
- $b^* > 0$ → amarelados;
- $b^* < 0$ → azulados;
- $b^* \approx \text{zero}$ → cores neutras (cinzas e brancos);
- $L^* \approx 100$ → translúcido/branco;
- $L^* \approx 0$ → opaco/preto.

A partir dos parâmetros L^* , a^* e b^* obtidos directamente da medição colorimétrica, é possível calcular a variação (Δ) destes mesmos parâmetros: ΔL^* , Δa^* e Δb^* , respectivamente, conforme as equações 4, 5 e 6 [58]:

$$\Delta L^* = Lf^* - Li^* \quad (\text{equação 4})$$

$$\Delta a^* = af^* - ai^* \quad (\text{equação 5})$$

$$\Delta b^* = bf^* - bi^* \quad (\text{equação 6})$$

Estes valores podem ser utilizados para controlo de qualidade ou melhoramento de fórmulas, uma vez que indicam o quão a amostra difere do padrão [58,60]:

- $\Delta L^* > 0 \rightarrow$ amostra mais clara que o padrão;
- $\Delta L^* < 0 \rightarrow$ amostra mais escura do que o padrão;
- $\Delta a^* > 0 \rightarrow$ amostra mais avermelhada do que o padrão;
- $\Delta a^* < 0 \rightarrow$ amostra mais esverdeada do que o padrão;
- $\Delta b^* > 0 \rightarrow$ amostra mais amarelada do que o padrão;
- $\Delta b^* < 0 \rightarrow$ amostra mais azulada do que o padrão.

É de notar que para cada um dos valores pode ser estipulado um valor de tolerância. Isto significa que, se os valores de variação se encontrarem fora da tolerância estipulada, então existe muita diferença entre as amostras em estudo e o padrão [58].

Adicionalmente, é possível calcular a diferença total de cor existente entre a amostra e o padrão. Este valor único - ΔE^* - é calculado através da *equação 7*, e tem em consideração as variações de L^* , a^* e b^* (nomeadamente ΔL^* , Δa^* e Δb^*) [58].

$$\Delta E^* = \sqrt{\Delta L^{*2} + \Delta a^{*2} + \Delta b^{*2}} \quad (\text{equação 7})$$

Tal como para os parâmetros ΔL^* , Δa^* e Δb^* , também é determinado um limite de tolerância para o parâmetro ΔE^* ; está proposto um limite de $\Delta E^* < 3,7$. Isto é o mesmo que afirmar que, se este parâmetro for inferior a 3,7, então a diferença total de cor (entre a amostra e o padrão) é visualmente imperceptível. Este critério expressa o limiar de percepção visual e é utilizado por vários autores [60].

Apesar do valor expresso pela ΔE^* quantificar a diferença total de cor entre a amostra e o padrão, não qualifica a diferença de cor; isto é, não é possível, apenas por este valor, determinar em que direcção a variação de cor se verificou (se ao nível do eixo de luminosidade, se no eixo vermelho/verde, ou se no eixo amarelo/azul). [60]

Outra limitação deste parâmetro é o facto de, no caso deste parâmetro se encontrar fora do limite de tolerância, não ser possível identificar qual dos parâmetros (ΔL^* , Δa^* e/ou Δb^*) estão fora de tolerância. O inverso também pode acontecer: ΔE^* estar dentro do limite de tolerância e algum/ou vários dos parâmetros estarem fora de tolerância, mas não dá informação de qual/quais [58].

Os valores numéricos de todos os parâmetros $L^*a^*b^*$ recolhidos por colorimetria CIELAB, para todas as amostras, constam na Tabela A5 (*ver anexos*), bem como o parâmetro ΔE^* (calculado a partir dos parâmetros $L^*a^*b^*$ segundo a equação 7).

Para além dos valores numéricos, os resultados obtidos por CIELAB podem ser apresentados de outra forma – *swatches* de cor – que são nada menos do que a tradução visual dos parâmetros $L^*a^*b^*$, por utilização de *softwares* de análise de imagem (por exemplo, Adobe Photoshop) [60].

No presente trabalho, como procedido por West *et al.* [56], foi utilizado o *software* Adobe Photoshop CC 2015 (Adobe Systems, Inc., San Jose, CA, USA), para converter todos os valores $L^*a^*b^*$ obtidos para *swatches* de cor, conforme exemplificado na Fig.50.

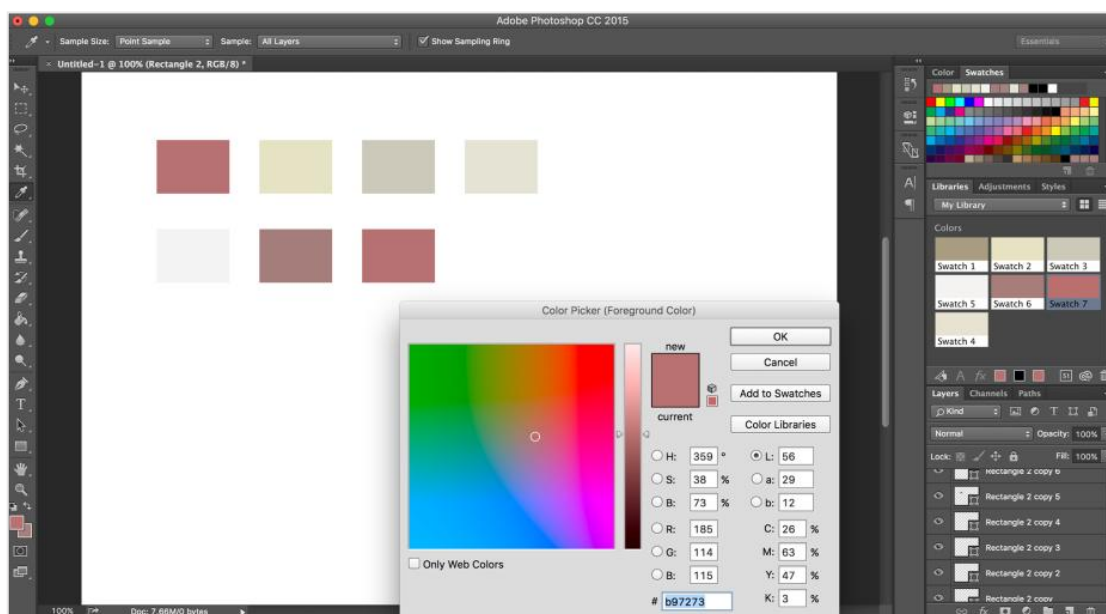


Fig. 50 - Exemplificação do processo de criação de *swatches* de cor por conversão das coordenadas CIELAB em adobe photoshop CC 2015.

Todos os resultados obtidos estão representados na Fig.51, devidamente identificados.

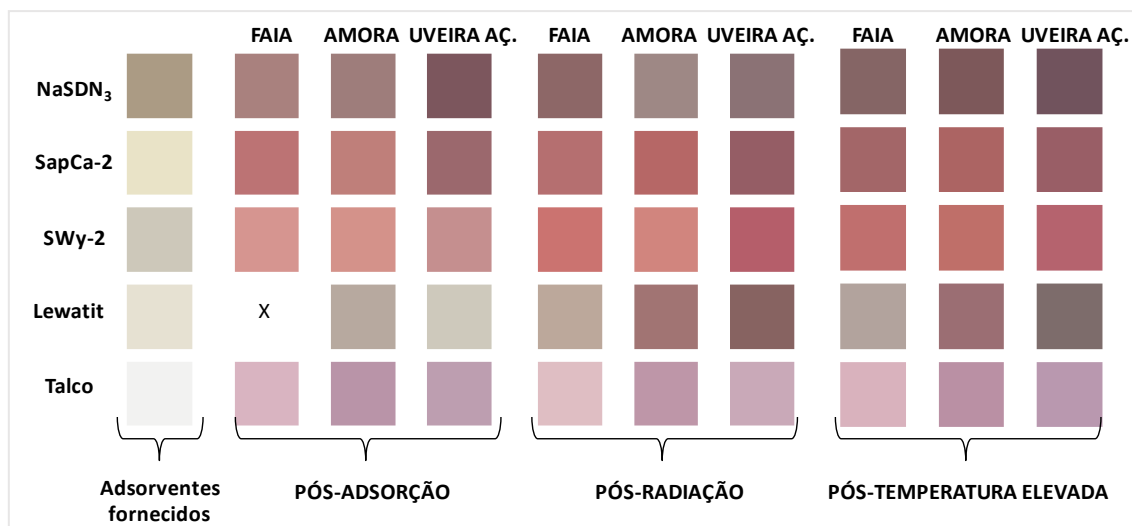


Fig. 51- Swatches de cor obtidos para todas as amostras, durante o estudo colorimétrico.

Interpretação dos resultados obtidos por CIELAB para avaliação da variação da cor das antocianinas

Apesar de todos os parâmetros $L^*a^*b^*$ terem influência directa na cor observada, a discussão dos resultados do presente trabalho basear-se-á, maioritariamente, no parâmetro a^* já que, normalmente, é este o parâmetro utilizado para analisar e interpretar a variação de cor das antocianinas [57].

A fim de facilitar o entendimento e seguimento do tema, a discussão dos resultados foi seccionada.

Primeiro serão discutidos os resultados colorimétricos obtidos para os adsorventes após serem submetidos ao processo de adsorção (designados por adsorventes carregados AC), que serão comparados com os adsorventes tal como foram fornecidos (AF). Este primeiro estudo, no fundo, pode ser considerado uma espécie de validação do método para aplicação aos estudos de estabilização de antocianinas imobilizadas em matrizes sólidas.

Em segundo lugar será avaliado a estabilidade de antocianinas adsorvidas em matrizes sólidas expostas a condições de extremas de degradação. No estudo da estabilidade de antocianinas adsorvidas a matrizes sólidas e expostas à radiação solar por 8 semanas (denominados adsorventes carregados irradiados-ACI) comparou-se os dados obtidos para os ACI e os dados obtidos para os AC. No estudo da estabilidade de antocianinas adsorvidas a matrizes sólidas e expostas temperaturas elevadas por 8

semanas (denominados adsorventes carregados sujeitos a temperaturas elevadas-ACT) são comparados os dados dos ACT em relação aos AC.

3.4.1. Análise colorimétrica - Adsorventes fornecidos (AF) vs. Adsorventes carregados (AC)

Os resultados obtidos para os AF e para os AC foram analisados e discutidos abaixo.

Os valores de a^* AC foram todos positivos, variando entre 3,58 e 28,79; em contraposição, os AF apresentaram valores negativos e positivos que variaram entre -2,58 e 1,84. Ao comparar os valores dos AC em relação aos AF, verificou-se que o parâmetro a^* de todos os AC aumentou, o que significa que o conteúdo de vermelho das amostras aumentou em relação aos AF.

Esta evidência é confirmada pela análise da variação deste parâmetro (Δa^*) (*ver anexo*, Tabela A5): todos os AC apresentaram uma variação positiva ($\Delta a^* > 0$) confirmando que são “mais vermelhos” do que os AF. Este resultado está dentro do esperado pois é um indicativo da presença das antocianinas imobilizadas na estrutura dos AC; simultaneamente, este dado é mais uma evidência que confirma que as antocianinas foram imobilizadas com sucesso na estrutura das matrizes sólidas.

Os valores de b^* , nos AC variaram entre -5,01 e 14,14, enquanto nos AF variaram entre 0,28 e 14,47. Apesar de nos AF todos os valores se apresentarem positivos, revelando um maior conteúdo de amarelo, nos AC foi verificado valores negativos, nomeadamente no caso do adsorvente talco, indicando que este adsorvente é mais azulado.

Independentemente dos valores de b^* serem positivos ou negativos, verificou-se duas tendências: no caso dos adsorventes NaSDN₃, SapCa-2, resina Lewatit e talco, foi constatado uma diminuição dos valores de b^* significando que têm o conteúdo de azul aumentado em relação aos AF; já na argila SWy-2 verificou-se um aumento dos valores de b^* para o dobro, passando de 7,72 (AF) para 13,08 (AC-faia) e para 14,14 (AC-amora), o que significa que se tornaram mais amareladas em relação aos AF.

Quanto ao primeiro caso (NaSDN₃, SapCa-2, Lewatit e talco), os resultados estão dentro do esperado pois o azul é uma das cores características aquando da presença de antocianinas.

No que respeita à argila SWy-2, também é um resultado válido pois a cor amarela é uma das cores atribuídas pelas antocianinas quando se encontram na forma estrutural de chalcona (correspondente a pH=6). Isto pode indicar que a argila SWy-2 pode induzir a alterações estruturais numa parte das antocianinas presentes. Foi ainda verificada uma outra tendência nesta argila: nos AC com antocianinas de uveira dos Açores imobilizadas, os valores de b^* mantiveram-se constantes em relação ao AF (7,62 para o AF e 8,34 para o AC-Uv. Açores).

Se tivermos em consideração o raciocínio anterior de que a argila SWy-2 pode estar a induzir alterações estruturais nas antocianinas, e tendo em conta que os valores se mantiveram constantes (e consequentemente o conteúdo de amarelo), o que pode estar a acontecer é que as antocianinas da uveira dos Açores têm a capacidade de manter a sua estrutura íntegra; isto é possível através de co-pigmentação entre os diferentes tipos de antocianinas presentes na uveira dos Açores, como já referido anteriormente. O fenómeno de co-pigmentação pode não ser verificado nos AC com faia e nos AC com amora pois apresentam menos diferenciação no que respeita às estruturas de antocianinas presentes, o que torna as antocianinas destas fontes naturais mais susceptíveis a alterações induzidas pelo meio.

Por análise da variação do parâmetro b^* (Δb^*), foi verificado que: a variação de b^* é negativa ($\Delta b^* < 0$) para os adsorventes NaSDN₃, SapCa-2, Lewatit e talco, em contraposição ao adsorvente SWy-2 cuja variação de b^* é positiva ($\Delta b^* > 0$). Isto é o mesmo que dizer que os AC ficaram mais azulados do que os AC, à excepção da SWy-2 que ficou mais amarelada em relação ao AF. Ambos os resultados estão dentro do esperado já que a imobilização de antocianinas na estrutura dos adsorventes resulta na atribuição de coloração característica das antocianinas aos adsorventes.

Os valores de L^* foram positivos para todas as amostras, com valor máximo de 76,80 e valor mínimo de 40,71, sendo o valor médio de 57,34. A interpretação deste parâmetro resultou na conclusão de que todas os AC são escuros, já que os valores obtidos se encontram mais próximos de 100 do que de 0. Ao comparar os valores de L^* dos AF e dos AC, foi verificado que nos AC o parâmetro L^* foi menor, comparativamente aos AF.

Por análise da variação do parâmetro L^* (ΔL^*), que se revelou negativa ($\Delta L^* < 0$), concluiu-se que todos os AC ficaram mais escuros do que os respectivos AF. Este resultado está de acordo com o observado e com o esperado, já que o conteúdo

molecular dos AF aumenta por adição de antocianinas à sua estrutura o que os tornamais escuros.

Nos *swatches* de cor, representados na Fig.52, é possível verificar as diferenças de cor interpretadas por análise dos parâmetros CIELAB, nomeadamente o aumento da cor vermelha nos AC, bem como o escurecimento dos AC em relação aos AF.

É importante referir que a resina Lewatit revelou-se um caso específico e, por isso, será discutido mais à frente individualmente.

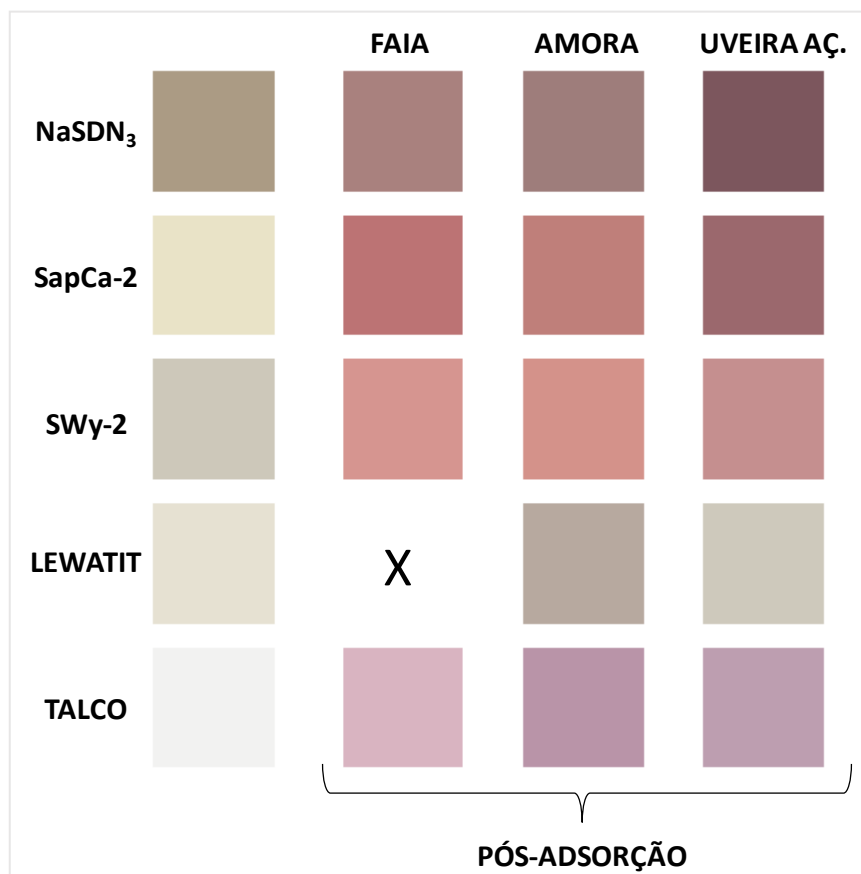


Fig. 52 - *Swatches* de cor resultantes da análise CIELAB. Comparação entre resultados obtidos para os adsorventes originais e os adsorventes imediatamente após adsorção de antocianinas.

Para além dos parâmetros já analisados - L^* , a^* , b^* , ΔL^* , Δa^* e Δb^* - é ainda possível calcular um outro parâmetro - ΔE^* - que traduz a diferença total de cor entre o AF e a AC, sendo que se este parâmetro for inferior a 3,7 ($\Delta E^* < 3,7$) a diferença de cor é visualmente imperceptível e, portanto, negligenciável [58,60].

Analisando este parâmetro, para todos os AC, foi constatado que os valores variaram entre 16,02 e 48,07 ($16,02 < \Delta E^* < 48,07$). Ora, não sendo nenhum dos valores inferior a 3,7, é concluído que todos os AC apresentaram diferenças

significativas de cor, comparativamente aos respectivos AF, o que está de acordo com o observado durante o trabalho.

Conforme já mencionado, a técnica colorimétrica CIELAB é vantajosa para fins de comparação de cor entre objectos diferentes, uma vez que uniformiza a cor de forma a ser interpretada mundialmente [59,60].

Nas condições de trabalho do presente estudo, e tal como exemplificado na Fig.53, o registo fotográfico das diferenças de cor mostrou ser igualmente eficiente; quando comparamos as cores dos sólidos em A (fotografia dos AF) e em B (*swatches* de cor obtidos por conversão dos valores de $L^*a^*b^*$) verificamos que são idênticas, ou, pelo menos, visualmente imperceptíveis.

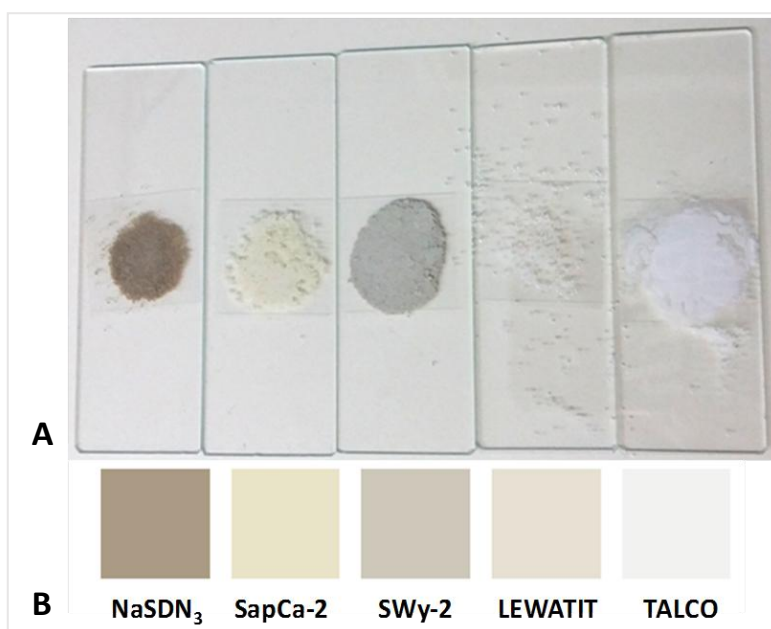


Fig. 53 – Comparação da cor real dos AF e *swatch* de cor obtido por CIELAB. A- fotografia; B- CIELAB.

No caso específico da resina Lewatit, a análise e discussão dos resultados obtidos baseou-se nas evidências visuais e nas evidências fotográficas recolhidas aquando dos ensaios. Esta decisão está relacionada com as limitações implícitas à utilização do método colorimétrico CIELAB para este adsorvente, relacionadas com a estrutura esférica da Lewatit que dificulta a leitura colorimétrica e obtenção de um resultado fidedigno.

Por comparação da cor da Lewatit fornecida com a cor da Lewatit carregada, verificamos que passou de branca/opaca (tal como descrito pelo fornecedor [44]) para roxa/avermelhada. O mesmo foi verificado para todas as Lewatit carregadas, tal como é

possível observar na Fig.54; isto indica que, de facto, se encontram antocianinas imobilizadas neste adsorvente.

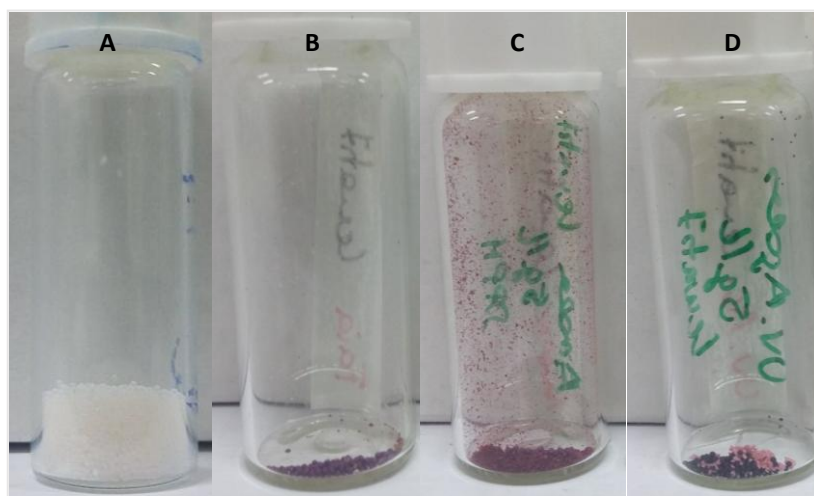


Fig. 54 - Comparação de cor entre Lewatits: A- fornecida; B- carregada com faia; C- carregada com amora; D- carregada com uveira Açores.

3.4.2. Avaliação da estabilidade de antocianinas adsorvidas e submetidas a condições de degradação – análise colorimétrica

3.4.2.1. Adsorventes carregados (AC) vs. Adsorventes carregados e expostos à radiação/irradiados (ACI)

A análise e discussão dos resultados neste estudo foi feita por comparação directa entre a cor dos ACI e a cor dos AC.

No que respeita aos valores de a^* obtidos para os ACI, verificou-se que variaram entre um mínimo de 5,27 e um máximo de 35,92; o facto de todos estes valores serem positivos indica que os ACI são avermelhadas, concluindo-se que, mesmo após serem expostas à radiação solar por 8 semanas, mantêm alguma da coloração inicial (do AC). Contudo, não é possível estabelecer uma tendência, no que se refere ao comportamento das antocianinas face à radiação incidente, pois foram verificadas diversas situações particulares que serão discutidas individualmente.

No caso da argila NaSDN₃ carregada com antocianinas de faia (NaSDN₃/faia), o valor de a^* (15,38) é ligeiramente superior ao respectivo AC (14,47). A mesma situação foi verificada no talco carregado com antocianina de amora (talco/amora) que apresentou um valor idêntico em relação ao AC (17,6 em contraposição aos 17,3).

Já no caso da SapCa-2 carregada com antocianina de faia (SapCa-2/faia) foi verificado o inverso da situação anterior, isto é, apresentou um conteúdo de vermelho ligeiramente inferior ao respectivo AC (28,1 e 28,79, respectivamente). O mesmo foi verificado no talco carregado com antocianina de uveira dos Açores (talco/uveira) que apresentou um conteúdo de vermelho de 13,81 em relação ao AC cujo conteúdo era de 14,05.

Nos ACI acima analisados, e pelas diferenças serem mínimas, o conteúdo de vermelho foi considerado constante ao fim das 8 semanas de exposição à radiação solar; isto significa que as antocianinas imobilizadas nestas matrizes são estabilizadas nas condições experimentais em questão. Por outras palavras, as referidas matrizes são adequadas para a estabilização de antocianinas expostas à radiação solar, sendo capazes de manter a coloração vermelha inicial.

Esta evidência foi confirmada pela análise do parâmetro ΔE^* que quantifica a diferença total de cor entre os ACI e os AC. No casos da SapCa-2/faia e do talco/amora, por apresentarem valores $\Delta E^* < 3,7$ (2,06 e 1,67, respectivamente), foi concluído que as diferenças de cor verificadas entre o ACI e o AC não são perceptíveis e, portanto, é considerado que conservaram a cor inicial. A impercepção da alteração de cor é confirmada por comparação dos *swatches* de cor que se encontram na Fig.55.

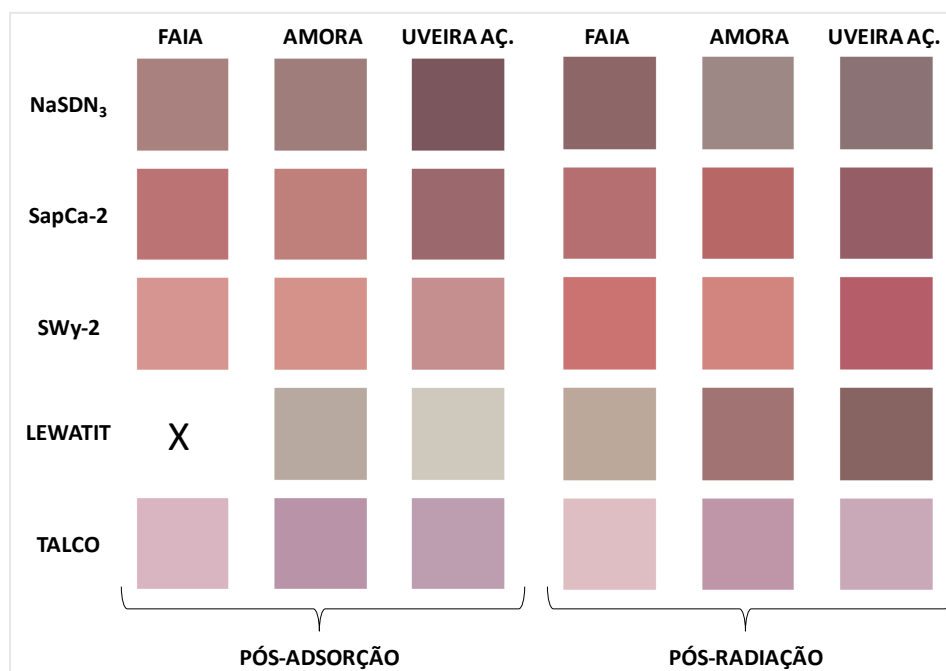


Fig. 55 - *Swatches* de cor resultantes da análise CIELAB. Comparação entre resultados obtidos para os adsorventes carregados (iniciais) e os adsorventes carregados expostos à radiação solar durante 8 semanas.

Já no caso da NaSDN₃/faia e do talco/uveira, apresentaram valores de $\Delta E^* > 3,7$ (10,49 e 4,84, respectivamente), o que significaria que a cor vermelha original não se teria conservado. Contudo, após análise minuciosa deste parâmetro, foi verificado que a diferença total de cor entre as amostras e o padrão advém, exclusivamente, do parâmetro ΔL^* , pois tanto as diferenças de a^* como de b^* revelaram-se insignificantes. Os valores de ΔL^* foram de -10,36 para a NaSDN₃/faia – indicando que o ACI tornou-se mais escuro do que o AC - e de 4,26 para o talco/uveira – o ACI ficou mais claro do que o AC – ambas as situações observáveis na Fig.55.

Uma vez que o parâmetro de interesse no presente estudo é, maioritariamente, o conteúdo de vermelho (a^*) também foi considerado que estes adsorventes são capazes de estabilizar as antocianinas quando imobilizadas nas suas estruturas.

Neste ponto de situação, temos que NaSDN₃/faia, SapCa-2/faia, talco/amora e talco/uveira são capazes de manter as antocianinas estáveis, por 8 semanas, mesmo quando expostos à radiação solar e, conseqüentemente, manter a cor avermelhada conferida pelas antocianinas aquando do processo de adsorção.

A argila SWy-2 revelou um comportamento particular: ao analisar o parâmetro de a^* foi verificado que, para todas as fontes de antocianinas (SWy-2/faia, SWy-2/amora e SWy-2/uveira dos Açores), o conteúdo de vermelho aumenta significativamente comparativamente aos respectivos AC, como é possível constatar na tabela 14.

Tabela 14 – Parâmetros de a^* e ΔE^* obtidos para a argila SWy-2.

<u>SWy-2</u>	a* AC	a* ACI	ΔE^*
Faia	23,22	33,69	14,99
Amora	24,02	27,5	4,06
Uveira dos Açores	20,38	35,95	21,02

Esta evidência foi confirmada através da análise da variação de conteúdo de vermelho (Δa^*) na argila SWy-2. Na SWy-2/faia, na SWy-2/amora e na SWy-2/uveira, a Δa^* foi de: 10,47, 3,48 e 15,54, respectivamente; uma vez que todos os valores são positivos ($\Delta a^* > 0$) foi confirmado que as amostras tornaram-se mais vermelhas do que os AC, após as 8 semanas de exposição solar. Os dados observados na argila SWy-2 poderão indicar que a argila poderá induzir a alterações estruturais nas antocianinas que

assumem a sua conformação mais estável – catião *flavilium* – caracterizado pela coloração vermelha.

As diferenças totais de cor (ΔE^*) entre os ACI e os AC, também foram analisadas. No que respeita à SWy-2, verificamos que os valores para SWy-2/faia, SWy-2/amora e para a SWy-2/uveira foram de 14,99, 4,06 e 21,02, respectivamente, que por serem todos superiores a 3,7, indicam que a diferença total de cor em todas as amostras é visualmente perceptível; tendo em conta que é da Δa^* que origina a maior contribuição para este valor, é de esperar que os ACI se apresentem mais vermelhos do que os AC. De facto, tendo em atenção os *swatches* de cor apresentados na Fig.55, verificamos que na SWy-2, em todas as fontes de antocianinas, as amostras se encontram mais vermelhas do que os respectivos padrões.

De acordo com comportamento descrito para a SWy-2, concluímos que este adsorvente, não é indicado para estabilizar antocianinas imobilizadas e expostas a condições de radiação incidente. Todavia parece ter a capacidade de induzir alterações estruturais nas antocianinas aumentando o conteúdo vermelho; apesar de serem necessários mais estudos que comprovem este dado, esta característica torna esta argila interessante.

Também na SapCa-2/amora e na SapCa-2/uveira foi verificado um aumento do conteúdo de vermelho (passando de 24,2 e de 21,4 nos AC para 28,1 e para 23,74 nos ACI respectivamente). Este comportamento também poderá indicar que esta argila induz a alterações estruturais nas antocianinas que assumem a conformação mais estável do catião *flavilium*. Então também não pode ser considerado estabilizador de antocianinas expostas à radiação.

Nos ACI talco/faia, NaSDN₃/amora e NaSDN₃/uveira: o conteúdo de vermelho diminuiu (por comparação do parâmetro a^* obtido para os ACI e AC, e confirmado pela análise da variação deste parâmetro (Δa^*) cujos resultados foram todos negativos ($\Delta a^* < 0$)). Isto significa que os ACI ficaram mais esverdeadas do que os respectivos AC ou, por outras palavras, perderam conteúdo vermelho. Isto pode indicar degradação das antocianinas imobilizadas, tornando os adsorventes impróprios para utilização na estabilização de antocianinas. Também o parâmetro ΔE^* confirma a diferença de cor entre os ACI e os AC - talco/faia = 5,91, NaSDN₃/amora = 6,04 e NaSDN₃/faia= 11,89 – já que todos os valores são superiores a 3,7. Concluímos que não são adequados para estabilização de antocianinas em condições de exposição solar pois não são capazes de manter a coloração vermelha.

O Talco/faia foi o ACI que apresentou uma maior diferença de cor com uma descoloração bastante evidente, comparativamente aos ACI Talco/amora e Talco/uveira (Fig.56).

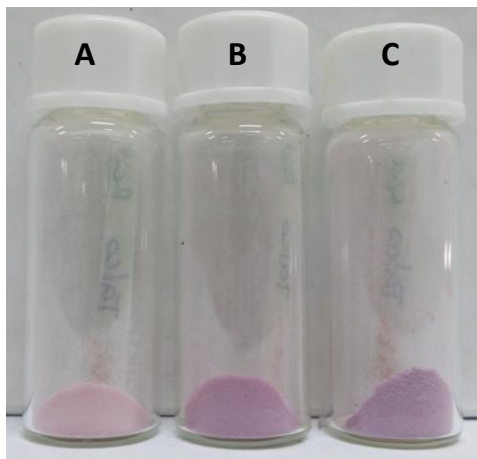


Fig. 56 - Comparação de cor entre o ACI Talco: A- faia; B- amora; C- uveira.

Para concluir, procedeu-se à análise da resina Lewatit que se baseou nas evidências fotográficas como já anteriormente referido.

O ACI Lewatit não manteve a coloração, comparativamente ao AC Lewatit; houve perda de intensidade, tal como mostra a Fig.57. Isto pode se dever a dois fenómenos distintos: por um lado a degradação total das antocianinas acompanhada pela perda de cor, ou, por outro lado, a alteração da estrutura das antocianinas (passando de catião *flavilium* (vermelho) a pseudobase carbinol (estrutura incolor)).

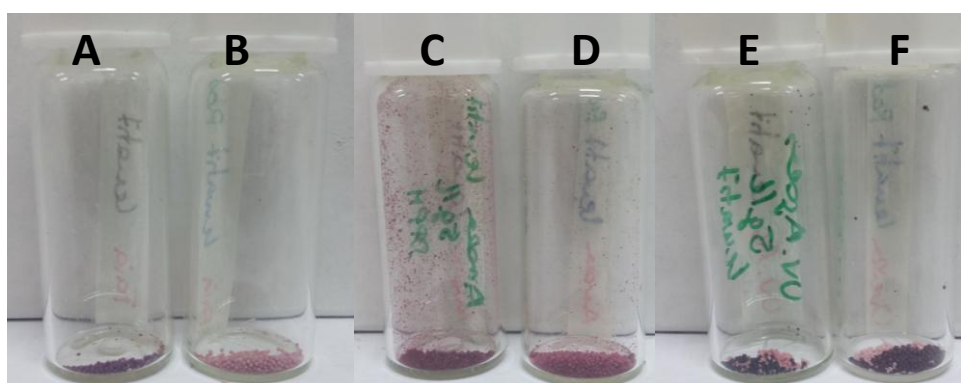


Fig. 57 - Comparação de cor da Lewatit: A- AC lewatit/faia; B- ACI lewatit/faia; C- AC lewatit/amora; D- ACI lewatit/amora; E- AC lewatit/uveira; F- ACI lewatit/uveira.

Ainda no que concerne ao ACI Lewatit, foram verificadas diferenças dependentes da fonte de antocianina: no ACI Lewatit/faia houve uma perda de cor mais acentuada, seguindo-se o ACI Lewatit/amora e por fim o ACI Lewatit/uveira cuja diferença era quase imperceptível (Fig.57); o ACI Lewatit/faia foi, inclusivamente, o primeira no qual se verificou descoloração. Isto pode ser justificado pela conteúdo de antocianinas adsorvidas (relacionado com a mistura de antocianinas presente no extrato – cianidinas na faia e amora e mistura de antocianinas na uveira).

Conclui-se que a resina Lewatit não pode ser utilizada enquanto estabilizador de antocianinas (e da cor conferida pelas mesmas) expostas a condições de exposição à radiação solar.

3.4.2.2. Adsorventes carregados (AC) vs. Adsorventes carregados e expostos à radiação/irradiados (ACI)

Ao fim das 8 semanas de estudo, a diferença de cor entre os ACI e os ACT foi notória: o lote dos ACT apresentou uma cor mais semelhante aos AC do que o lote dos ACI. Estes resultados serão discutidos e justificados mais em pormenor.

Após a análise dos valores numéricos do parâmetro a^* obtidos para os ACT, foram verificados três comportamentos distinto: perda, ganho e manutenção do conteúdo de vermelho.

No entanto, foram destacadas duas situações em concreto, nomeadamente os adsorventes talco e SWy-2 uma vez que ambos mostraram o mesmo comportamento para todas as fontes de antocianinas.

No que respeita ao talco, foi verificado que o conteúdo de vermelho aumentou nos ACT, comparativamente aos AC (15,38 vs. 15,67 na faia; 17,3 vs. 18,76 na amora e 14,5 vs. 15,79 para a uveira, respectivamente). Os parâmetros de variação de conteúdo vermelho (Δa^*) indicam o mesmo: todos os valores se revelaram superiores a 0, como consta na Tabela A5 (*ver anexo*), indicando que os ACT ficaram mais vermelhos comparativamente aos AC. Os valores de ΔE^* foram analisados e revelaram-se todos inferiores a 3,7, tal como é possível verificar na tabela 15; isto significa que a diferença total de cor entre os ACT e os AC é visualmente impercetível.

Tabela 15 - Parâmetros colorimétricos obtidos para o adsorvente Talco.

<i>Talco</i>	a* AC	a* ACT	Δa^*	ΔE^*
Faia	15,38	15,67	0,29	1,76
Amora	17,3	18,76	1,46	1,89
Uveira dos Açores	14,5	15,79	1,29	2,91

Por visualização e comparação de todos os *swatches* de cor (Fig.58) obtidos para o talco, verificou-se que, de facto, a diferença de cor entre o ACT e o AC não é visualmente perceptível. Foi, então, foi concluído que o talco, nestas condições experimentais, e independentemente da fonte natural de antocianinas, tem a capacidade de estabilizar antocianinas e manter a coloração, em condições de temperatura elevada.

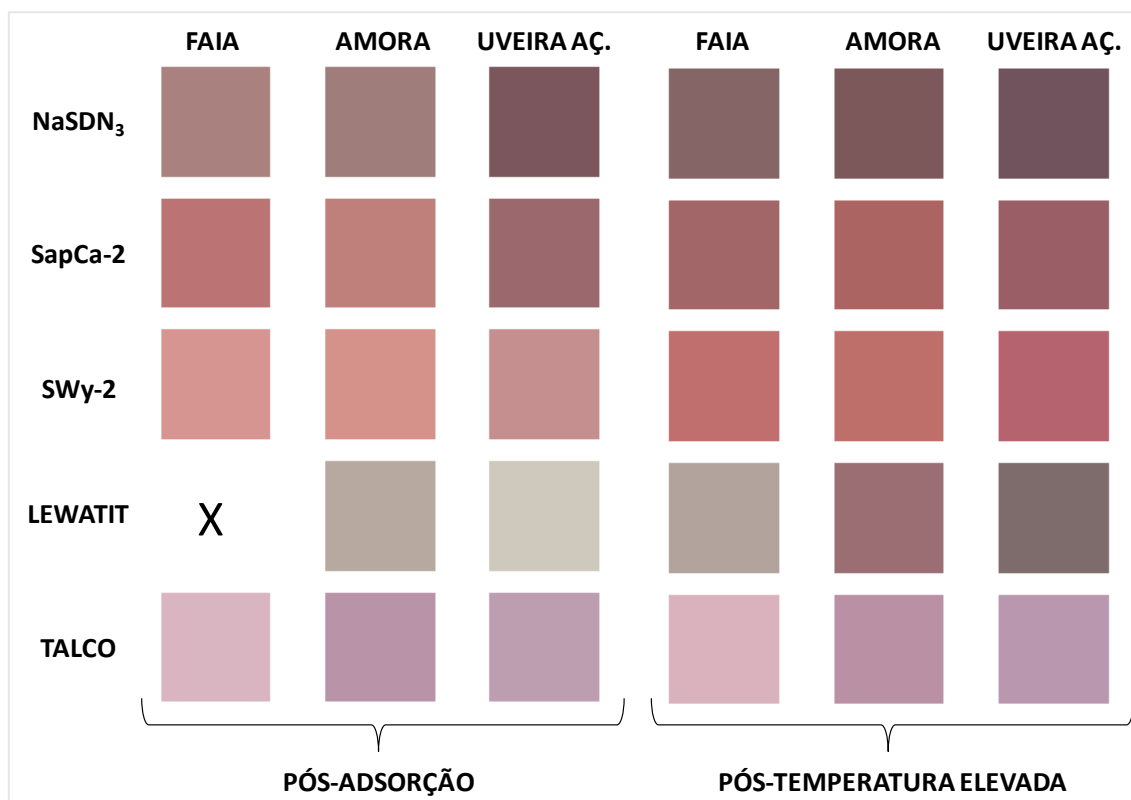


Fig. 58 - *Swatches* de cor resultantes da análise CIELAB. Comparação entre resultados obtidos para os AC e para os ACT.

Em relação ao adsorvente SWy-2, por análise do parâmetro a^* dos ACT verificou-se um aumento do conteúdo de vermelho; todos os valores de variação de conteúdo de vermelho (Δa^*) dos ACT, em relação aos respetivos AC, foram positivos (7,99 para a faia, 7,09 para a amora e 13,6 na uveira dos Açores) indicando que ficaram mais vermelhos do que os AC. O aumento da coloração vermelha influencia

directamente a diferença total de cor entre os ACT e os AC; os valores de ΔE^* são todos superiores a 3,7 (14,57 na faia, 13,60 na amora e 18,79 na uveira, respectivamente) o que confirma que a diferença total de cor é significativa.

Como já referido no estudo de estabilização à radiação, estes dados poderão indicar que a argila SWy-2 induz alterações estruturais nas antocianinas imobilizadas, fazendo com que assumam a conformação mais estável do ião *flavilium* que se caracteriza pela coloração vermelha que atribui. Conclui-se que esta argila não pode ser utilizada enquanto estabilizador das antocianinas a condições de temperaturas elevadas; no entanto, o comportamento das antocianinas quando imobilizadas neste adsorvente pode ser interessante em situações cuja coloração vermelha seja a pretendida e não seja possível manipular o pH (para obter o catião *flavilium*).

Os restantes adsorventes apresentaram comportamentos oscilantes.

Nos casos da NaSDN₃/faia, SapCa-2/faia e NaSDN₃/uveira, foi verificada a perda de conteúdo vermelho - respectivos valores de a^* de 12,81, 25,06 e 14,25 – em comparação aos respectivos AC – com valores de a^* de 14,47, 28,79 e 16,9. A variação de conteúdo de vermelho (Δa^*) confirmou a perda de conteúdo de vermelho – todos os valores foram negativos (-1,66, -3,73 e -2,65, respectivamente) indicando que os ACT ficaram mais esverdeados do que os AC, por perda de coloração vermelha. Estas evidências indicam que estes adsorventes não são capazes de estabilizar antocianinas em condições de temperatura elevada, o que se traduz numa alteração acentuada de cor entre os ACT e os AC, situação confirmada pelos valores de $\Delta E^* > 3,7$ (Tabela A5 *ver anexos*).

Nos ACT NaSDN₃/amora, SapCa-2/amora e SapCa-2/uveira foi verificado um aumento do conteúdo de vermelho (a^*) em relação aos respectivos AC - passaram de 12,46 para 15,59, de 24,2 para 28,7 e de 21,4 para 26,76, respectivamente – sendo este comportamento confirmado pelos valores de Δa^* (3,13; 4,5 e 3,36) que por serem todos positivos ($\Delta a^* > 0$) indicam que os ACT ficaram mais vermelhos do que os AC. A diferença total de cor entre os ACT e os AC foi considerada significativa: os valores de (ΔE^*) foram superiores a 3,7 (14,63; 9,93 e 4,37, respectivamente). As evidências – tal como discutido anteriormente para a argila SWy-2 – indicam que os adsorventes, em condições de temperatura elevada, podem induzir a alterações estruturais nas antocianinas imobilizadas que adquirem a conformação do catião *flavilium* (forma vermelha da antocianina).

Concluiu-se que estes adsorventes não são adequados para estabilizar antocianinas em condições de temperatura elevada pois, apesar de não ter havido perda de conteúdo vermelho, não têm capacidade de manter a cor estável. Tal como para a argila SWy-2, a utilização destes adsorventes pode ser interessante em situações em que, na impossibilidade de alterar o pH, o catião *flavilium* seja a forma estrutural de interesse.

Quanto ao adsorvente Lewatit, a discussão dos resultado para este adsorvente foi baseada nas evidências fotográficas recolhidas ao longo do estudo (pelas limitações de aplicação do CIELAB, já referidas, relacionadas com a estrutura da resina).

Por comparação dos ACT Lewatit com os AC Lewatit (Fig. 59) foi possível verificar que, mesmo após exposição a temperaturas elevadas por 8 semanas, a cor dos AC (Fig.59 A1, A2 e A3) foi mantida nos ACT (Fig.59 B1, B2 e B3).



Fig. 59 - Comparação entre a cor da Lewatit: A1 – AC Lewatit/; B1- ACT Lewatit/faia; A2 – AC Lewatit/amora; B2 – ACT Lewatit/amora; A3 – AC Lewatit/uveira; B3 – ACT Lewatit/uveira.

As evidências acima descritas indicam que a Lewatit poderá ter capacidade de estabilizar antocianinas expostas a condições de temperatura elevadas; contudo, pela por se tratarem de evidências fotográficas e pela falta de dados científicos, não é correcto concluir sobre o potencial da Lewatit enquanto estabilizador de antocianinas nas condições descritas.

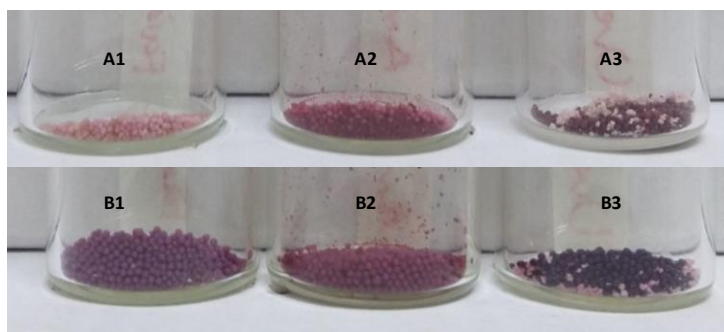


Fig. 60 - Comparação de cor entre Lewatit: A1 – ACI Lewatit/faia; B1 – ACT Lewatit/faia; A2 – ACI Lewatit/amora; B2 – ACT Lewatit/amora; A3 – ACI Lewatit/uveira; B3 – ACT Lewatit/uveira

Adicionalmente - por comparação entre os ACI Lewatit (Fig.60, A1, A2 e A3) e os ACT Lewatit (Fig.60 B1, B2 e B3) – foi imediata a percepção de que os ACT Lewatit apresentaram um melhor desempenho enquanto estabilizadores de antocianinas (traduzido pela coloração mais intensa que os ACT Lewatit apresentaram em relação aos ACI Lewatit).

3.5. Conclusões

Após a realização dos estudos de estabilidade de antocianinas imobilizadas em matrizes sólidas, são várias as conclusões tiradas.

As alterações de cor dos produtos constituem um indicador objectivo utilizado na avaliação da qualidade. A medição precisa dos parâmetros de cor é fundamental e o CIELAB constitui o método colorímetro mais vantajoso e utilizado em várias indústrias já que é objectivo ao uniformizar a interpretação da cor pois traduz a cor por valores numéricos/parâmetros colorimétricos.

A análise directa dos parâmetros colorimétricos ($a^*b^*L^*$) é o método mais objectivo para interpretar a cor mas podem ser traduzidos em *swatches* de cor permitindo a visualização da cor codificada.

Foi possível validar a aplicação do método CIELAB na avaliação da cor das matrizes sólidas, em estudo, contendo antocianinas imobilizadas. Pela estrutura esférica, a resina Lewatit não pode ser analisada por colorimetria CIELAB.

Quanto aos estudos de estabilização das antocianinas imobilizadas expostas a condições de degradação acelerada – exposição a radiação e a temperaturas elevadas – apenas foi possível tirar conclusões acerca dos adsorventes Lewatit, talco e argila SWy-2.

A resina Lewatit não apresenta potencial enquanto matriz estabilizadora, contrariamente ao talco que revelou ser o adsorvente com mais potencial de ser utilizado enquanto estabilizador de antocianinas expostas a radiação e a temperaturas elevadas.

A argila SWy-2 revelou um comportamento interessante já que, com antocianinas imobilizadas na sua estrutura, quando é exposta a radiação e a temperaturas elevadas, parece ter capacidade de induzir a alterações estruturais nas antocianinas que, possivelmente, adquirem a conformação do catião *flavilium*. Concluiu-se que, apesar

desta argila não poder ser utilizada enquanto estabilizador de antocianinas, poderá ser útil em situações que a estrutura da antocianina pretendida seja o catião *flavilium* mas que o pH não possa ser manipulado.

Quanto à argila NaSDN₃ e SapCa-2, não podem ser considerados potenciais estabilizadores de antocianinas pois apresentaram comportamentos oscilantes e dependentes, não só da condição de degradação (radiação incidente ou temperatura elevada) mas também da fonte natural das antocianinas.

Em jeito de crítica/perspetiva futura, por indisponibilidade da técnica não foram efectuadas análises CIELAB:

- nos extratos de antocianina liofilizados - nem recém preparados nem após 8 semanas nas 3 condições (protegidos, expostos à radiação e expostos a temperaturas elevadas). Assim não foi possível concluir sobre possíveis alterações nas estruturas das antocianinas que constituem os extratos.
- nos adsorventes fornecidos – nem em condições de exposição à radiação, nem em condições de exposição a temperaturas elevadas. Assim, foi partido do princípio que a cor dos adsorventes seria estável.

Para que fosse possível tirar mais conclusões, o ensaio teria de ser repetido com realização de medições CIELAB em todas as condições acima descritas e em menores períodos de tempo (possivelmente com 1 leitura por semana).

III. Conclusões

O objectivo do presente trabalho foi a estabilização de antocianinas obtidas a partir de fontes naturais por imobilização em matrizes sólidas porosas e, simultaneamente, aprofundar o conhecimento sobre o comportamento dos adsorventes face ao processo de imobilização. As antocianinas extraídas a partir de bagas de faia, amoras e mirtilos foram imobilizadas em adsorventes orgânicos e inorgânicos (resina sintética Lewatit, argilas - NaSDN₃, SapCa-2, SWy-2 – e talco farmacêutico); os complexos foram submetidos a condições de degradação acelerada (exposição a radiação e temperatura elevada). A estabilidade da cor dos complexos foi monitorizada pelo método colorimétrico CIELab.

Os resultados obtidos ao longo de todo o projecto estão compilados na Tabela A6 dos anexos.

As antocianinas foram extraídas a partir das fontes naturais por extracção sólido-líquido (solução metanólica 80:20, 7% ácido acético); por este método não ser selectivo para os compostos de interesse, procedeu-se à purificação com acetato de etilo, que se revelou ineficaz já que conduziu a grandes perdas de antocianina. A repetição da extracção de antocianinas, sem purificação, teria sido benéfica para o trabalho pois conduziria a maiores quantidades de antocianinas disponíveis; não foi possível a repetição por escassez de material vegetal.

Com vista à maximização do processo de adsorção, a adequação dos parâmetros de trabalho foi fundamental. Concluiu-se que o pH deveria ter sido melhor ajustado pois é em valores de pH mais baixos ($1 < \text{pH} < 2$) que se verifica uma maior concentração de catião *flavilium* (forma da antocianina pretendida, que se caracteriza pela coloração vermelha mais acentuada); este parâmetro foi limitado por uma das matrizes ser uma resina sintética.

A quantificação da antocianina adsorvida por espectrofotometria UV-Vis a 517nm foi útil para o trabalho desenvolvido já que as soluções em estudo eram constituídas por misturas complexas de antocianinas. A quantificação por LC-MS teria sido mais vantajosa já que permitiria uma determinação mais precisa do conteúdo de antocianinas e dos outros compostos presentes no extrato; adicionalmente iria permitir averiguar possíveis competições entre antocianinas e outros compostos pelo adsorvente no processo de adsorção.

O estudo da capacidade de adsorção dos adsorventes e do seu comportamento ao longo do processo de adsorção permitiu agrupar os adsorventes em materiais laminares (argilas) e não-laminares (Lewatit e talco). Foi possível concluir que a capacidade de

adsorção dos adsorventes depende da natureza do próprio adsorvente e é directamente proporcional à concentração da solução de extrato de antocianina e ao tempo de contacto (até que seja atingido o equilíbrio). Os materiais laminares atingem o equilíbrio de adsorção mais rapidamente comparativamente aos materiais não-laminares: as argilas atingem o equilíbrio em 20 minutos enquanto a Lewatit e o talco demoram 80 e 120 minutos, respectivamente.

A utilização do XRD no presente trabalho teria sido vantajosa já que iria permitir tirar mais conclusões acerca da localização das antocianinas na estrutura dos adsorventes (superfície interna, superfície externa ou ambas). Por avaria do equipamento não foi possível a utilização da técnica.

Da avaliação da estabilidade das antocianinas adsorvidas por quantificação da actividade antioxidante pelo método do DPPH, concluiu-se que o método não foi eficaz nas condições de trabalho pois as antocianinas estão imobilizadas em estruturas sólidas e, por isso, menos disponíveis para reagir com o DPPH.

Da avaliação da estabilidade das antocianinas adsorvidas por análise CIELAB, e nas condições experimentais em questão, apenas foi possível concluir que a resina Lewatit não estabiliza e que a argila SWy-2 pode ser útil em situações de impossibilidade de manipulação do pH. O estudo da estabilidade da cor deveria ter sido repetido para estudo mais pormenorizado; por indisponibilidade do colorímetro CIELAB não foi possível.

Considerações finais:

A resina Lewatit revelou ser o adsorvente com maior capacidade de adsorção de antocianinas, atingindo o equilíbrio passados 80 minutos de contacto, mas não apresenta capacidade de estabilizar antocianinas imobilizadas na sua estrutura.

O talco, apesar de apresentar algum potencial de estabilização de antocianinas imobilizadas, foi o pior de todos os adsorventes pois para além de ser difícil de manipular (por ser hidrofóbico) imobiliza baixas quantidades de antocianina.

As argilas revelaram ser os adsorventes mais adequados, pois para além de se tratar de materiais naturais, apresentam capacidades de adsorção de antocianinas na ordem dos 20 mg/g. São necessários mais dados para ser possível concluir sobre a capacidade destes sólidos porosos estabilizarem antocianinas.

IV. Referências

1. Cavalcanti RN, Santos DT, Meireles MAA. Non-thermal stabilization mechanisms of anthocyanins in model and food systems-An overview. *Food Res. Int.* 2011;44(2):499–509.
2. Ogawa M, Takee R, Okabe Y, Seki Y. Bio-geo hybrid pigment; clay-anthocyanin complex which changes color depending on the atmosphere. *Dyes and Pigments.* 2017;139:561–565.
3. Kohno Y, Kato Y, Shibata M, Fukuhara C, Maeda Y, Tomita Y, et al. Enhanced stability of natural anthocyanin incorporated in Fe-containing mesoporous silica. *Microporous Mesoporous Materials.* 2015;203:232–237.
4. Todaro A, Cimino F, Rapisarda P, Catalano AE, Barbagallo RN, Spagna G. Recovery of anthocyanins from eggplant peel. *Food Chem.* 2009;114(2):434–9.
5. Scordino M, Di Mauro A, Passerini A, Maccarone E. Adsorption of Flavonoids on Resins: Cyanidin 3-Glucoside. *J. Agric. Food Chem.* 2004;52(7):1965–72.
6. Giusti MM, Wrolstad RE. Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-visible Spectroscopy. *Handb. Food Anal. Chem.* 2005;19–31.
7. He F, Mu L, Yan GL, Liang NN, Pan QH, Wang J, et al. Biosynthesis of anthocyanins and their regulation in colored grapes. *Molecules.* 2010;15(12):9057–91.
8. Xiong S, Melton LD, Easteal AJ, Siew D. Stability and antioxidant activity of black currant anthocyanins in solution and encapsulated in glucan gel. *J. Agric. Food Chem.* 2006;54(17):6201–8.
9. Castañeda-Ovando A, Pacheco-Hernández MDL, Páez-Hernández ME, Rodríguez J a., Galán-Vidal CA. Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chem.* 2009;113(4):859–71.
10. Li, X., Ma, H., Huang, H., Li, D., Yao S. Natural anthocyanins from phytoresources and their chemical researches. *Nat. Prod. Res. Former. Nat. Prod.* 2013.27(4-5) 6456-6469.

IV. Referência

11. Brouillard R, Chassaing S, Isorez G, Kueny-Stotz M, Figueiredo P. The Visible Flavonoids or Anthocyanins: From Research to Applications. Recent Adv. Polyphen. Res. 2010;2:1–22.
12. Baroni S. Accurate and Inexpensive Prediction of the Color Optical Properties of Anthocyanins in Solution. J. Phys. Chem. A 2015. 119:3816–3822.
13. Raghvendra, Sharma V, Shakya A, Hedaytullah M, Arya GS, Mishra A, et al. Chemical and potential aspects of anthocyanins - A water-soluble vacuolar flavonoid pigments: A review. Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res. 2011;6(1):28–33.
14. Hariram S, Won S. Edible berries: Bioactive components and their effect on human health. Nutrition. 2014;30(2):134–44.
15. Munin A, Edwards-Lévy F. Encapsulation of natural polyphenolic compounds; a review. Pharmaceutics. 2011. 3, 793–829.
16. Tobergte DR, Curtis S. Bioactive compounds from natural sources. Isolation, characterisation and biological properties. Taylor and Francis Inc. New York and London. 2004.
17. Georgiev V, Ananga A, Tsoleva V. Recent advances and uses of grape flavonoids as nutraceuticals. Nutrients. 2014;6(1):391–415.
18. Crozier, A., Clifford, M.N., Ashihara H. Plant Secondary Metabolites: Occurrence, Structure and Role in the Human Diet. Taylor and Francis Inc. New York and London. 2006.
19. McDougall GJ, Fyffe S, Dobson P, Stewart D. Anthocyanins from red cabbage - stability to simulated gastrointestinal digestion. Phytochemistry. 2007;68(9):1285–94.
20. Selim K, Khalil K, Abdel-Bary M, Abdel-Azeim N. Extraction, encapsulation and utilization of red pigments from Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) as natural food colourants. Food Science and Technology Dept. Fayoum Univ. Egypt. 2008.

21. Teixeira-Neto Â A., Izumi C, Temperini ML A, Ferreira A, Constantino VRL. Hybrid materials based on smectite clays and nutraceutical anthocyanins from the Açaí fruit. *Eur. J. Inorg. Chem.* 2012;(32):5411–5420.
22. Cabrita L, Fossen T, Andersen ØM. Colour and stability of the six common anthocyanidin 3-glucosides in aqueous solutions. *Food Chem.* 2000;68(1):101–107.
23. Tsanova-Savova S, Dimov S, Ribarova F. Anthocyanins and Color Variables of Bulgarian Aged Red Wines. *J. Food Compos. Anal.* 2002;15(6):647–654.
24. Kohno Y, Kinoshita R, Ikoma S, Yoda K, Shibata M, Matsushima R, et al. Stabilization of natural anthocyanin by intercalation into montmorillonite. *Appl. Clay Sci.* 2009;42(3–4):519–523.
25. Munin A, Edwards-Lévy F. Encapsulation of natural polyphenolic compounds; a review. *Pharmaceutics.* 2011. 3, 793-829.
26. Chang X-L, Wang D, Chen B-Y, Feng Y-M, Wen S-H, Zhan P-Y, et al. Adsorption and Desorption Properties of Macroporous Resins for Anthocyanins from the Calyx Extract of Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.). *J. Agric. Food. Chem.* 2012.60,2368-2376.
27. Apak R, Özyürek M, Güçlü K, Çapanoğlu E. Antioxidant Activity/Capacity Measurement. 2. Hydrogen Atom Transfer (HAT)-Based, Mixed-Mode (Electron Transfer (ET)/HAT), and Lipid Peroxidation Assays. *J. Agric. Food Chem.* 2016;64(5):1028–45.
28. Simidou MAZT. Use of Reference Compounds in Antioxidant Activity Assessment. 2007;5452–60.
29. Cort WM, Scott JW, Araujo M, Mergens WJ, Cannalunga MA, Osadca M, et al. Antioxidant Activity and Stability of. 1975;174–8.
30. Lopes TJ, Gonçalves OH, Barros RB, Rodrigues Capelli FC, Francisco Machado RA, Novy Quadri MG, et al. Adsorption of natural dyes on clay fixed on polymers. *Brazilian Arch. Biol. Technol.* 2005;48(SPEC. ISS.):275–80.

31. Meireles MA a. Extracting Bioactive Compounds for Food Products - Theory and Applications. Contemp. Food Eng. Florida. 2009. Disponível em: <http://cst.ur.ac.rw/library/Food%20Science%20books/batch1/Extracting%20Bioactive%20Compounds%20for%20Food%20Products%20Theory%20and%20Applications.pdf>
32. Carmody O, Frost R, Kokot S. Surface characterisation of selected sorbent materials for common hydrocarbon fuels. Surface Science.2007;601:2066–2076.
33. Lopes TJ, Gonçalves OH, Quadri MGN, Machado RAF, Quadri MB. Adsorption of anthocyanins using clay-polyethylene nanocomposite particles. Appl. Clay Sci. 2014;87:298–302.
34. Luisa M, Moure A, Domínguez H, Carlos J. Recovery , concentration and purification of phenolic compounds by adsorption : A review. 2011;105:1–27.
35. Yang RT. Adsorbents: Fundamentals and applications. John Wiley & Sons Inc. Hoboken, New Jersey. 2003.
36. Vários autores. Clay Surfaces - Fundamentals and Applications. Vol.1. Elsevier Academic Press.2004.
37. Fernandes C. Argilas modificadas como catalisadores ácidos sólidos. Tese de Doutorado. Universidade da Madeira. 2007.
38. Crini G. Non-conventional low-cost adsorbents for dye removal: A review. Bioresour. Technol. 2006;97(9):1061–85.
39. Lopes TJ, Quadri MGN, Quadri MB. Recovery of anthocyanins from red cabbage using sandy porous medium enriched with clay. Appl. Clay Sci. 2007;37(1–2):97–106.
40. The Clay Minerals Society. Available from: <http://www.clays.org/Sourceclays.html>
41. Soriano M, Melgosa M, Sanchez-Maranon M, Delgado G, Gámiz E, Delgado R. Whiteness of talcum powders as a quality index for pharmaceutical uses. Color Res. Appl. 1998;23(3):178–185.

42. Blount a. M, Vassiliou a. H. Identification of chlorite and serpentine in cosmetic or pharmaceutical talc. *Environ. Health Perspect.* 1983; 51(2):379–85.
43. Viseras C, Aguzzi C, Cerezo P, Lopez-Galindo A. Uses of clay minerals in semisolid health care and therapeutic products. *Appl. Clay Sci.* 2007;36(1–3):37–50.
44. Lanxess. LEWATIT VP OC 1064 MD PH. 2011. p. 1–5.
45. Spínola V, Llorent-Martínez E., Gouveia S, Castilho PC. Myrica faya : A New Source of Antioxidant Phytochemicals. *J. Agric. Food. Chem.* 2014. 62. 9722–9735.
46. Wang E, Yin Y, Xu C, Liu J. Isolation of high-purity anthocyanin mixtures and monomers from blueberries using combined chromatographic techniques. *J. Chromatogr. A.* 2014;1327:39–48.
47. Conidi C, Rodriguez-Lopez a. D, Garcia-Castello EM, Cassano a. Purification of artichoke polyphenols by using membrane filtration and polymeric resins. *Sep. Purif. Technol.* 2015;144:153–61.
48. Abdullah MA, Chiang L, Nadeem M. Comparative evaluation of adsorption kinetics and isotherms of a natural product removal by Amberlite polymeric adsorbents. *Chem. Eng. J.* 2009;146(3):370–6.
49. Fernandes N. Evaluation of Anthocyanins Stability by Adsorption in Organic and Inorganic Adsorbents. Project Report. 2015.
50. Buran TJ, Sandhu AK, Li Z, Rock CR, Yang WW, Gu L. Adsorption/desorption characteristics and separation of anthocyanins and polyphenols from blueberries using macroporous adsorbent resins. *J. Food Eng.* 2014;128:167–73.
51. Sarker S, Latif Z, Gray A. Natural products isolation. Humana Press. New Jersey. 2006.
52. Bulut Y, Aydin H. A kinetics and thermodynamics study of methylene blue adsorption on wheat shells. *Desalination.* 2006;194(1–3):259–67.

53. Lima E, Martínez-Ortiz MJ, Fregoso E, Méndez-Vivar J. Capturing natural chromophores on natural and synthetic aluminosilicates. *Stud. Surf. Sci. Catal.* 2007.
54. Fan X, Parker DJ, Smith MD. Adsorption kinetics of fluoride on low cost materials. *Water Res.* 2003;37(20):4929–37.
55. Gordon MH, Paiva-Martins F, Almeida M. Antioxidant activity of hydroxytyrosol acetate compared with that of other olive oil polyphenols. *J. Agric. Food Chem.* 2001;49(5):2480–5.
56. West ME, Mauer LJ. Color and chemical stability of a variety of anthocyanins and ascorbic acid in solution and powder forms. *J. Agric. Food Chem.* 2013;61(17):4169–79.
57. Pedisic, Sandra. Levaj, Branka. Dragovic-uzelac, Verica. Skevin, Dubravka. Skendrovic Babojelic M. Color Parameters and Total Anthocyanins of Sour Cherries (*Prunus Cerasus* L.) during ripening. *Agriculturae Conspectus Scientificus.* 2009. 74 (3). 259–62.
58. CIE / Lab (L * a * b) coding. 2014. p. 1–4. Available from: <https://www.hunterlab.com/>
59. Liang Z, Sang M, Fan P, Wu B, Wang L, Yang S, et al. CIELAB coordinates in response to berry skin anthocyanins and their composition in vitis. *J. Food Sci.* 2011;76(3):490–7.
60. Takatsui F. Sistema cie lab: análise computacional de fotografias. Dissertação de Pós-Graduação. Araraquara. 2011.
61. Montes C, Vicario IM, Raymundo M, Fett R, Heredia FJ. Application of tristimulus colorimetry to optimize the extraction of anthocyanins from Jaboticaba (*Myrcia Jaboticaba* Berg.). *Food Research International.* 2005;38 (8-9).983–988.
62. Minolta. CHROMA METER CR-300.pdf. Disponível em: https://www.konicaminolta.com/instruments/download/instruction_manual/color/pdf/cr-400-410_instruction_eng.pdf

V. Anexos

Tabela A 1 - Reagentes e compostos de referência.

Nome	Fornecedor (pureza)
Acetona	JMGS, Lda. (99,7%)
Reagente de Folin-Ciocalteu	PANREAC (n.a.*)
Carbonato de sódio	SIGMA-ALDRICH ($\geq 99,8\%$)
Hidróxido de sódio	PANREAC (98,0%)
Dihidrogeno fosfato de potássio	MERK ($\geq 99,5\%$)
Etanol	RIEDEL-DE HAËN (abs.)
Metanol	FISHER SCIENTIFIC (99,99%)
Ácido clorídrico	FISHER (37%)
DPPH	FLUKA CHEMIKA ($\geq 85\%$)
Trolox	FLUKA CHEMIKA ($\geq 98\%$)

*n.a. indica *não aplicável*

Tabela A 2 – Equipamentos.

Nome	Fornecedor
Balança de humidade	KERN DBS 60-3
Balança analítica	METTLER TOLEDO AB204
Banho de ultra-sons	BRANSON 2510
Centrifugadora	SIGMA 3K30
Agitador mecânico (<i>Orbital shaker</i>)	HEIDOLPH REAX 2
Evaporador rotativo	BUCHI Waterbath B-480
Liofilizador	CHRIST Alpha 1-2 LD Plus
Espectrofotómetro	PERKIN ELMER UV-Vis
Placa de agitação e aquecimento	HEIDOLPH MR Hei-Standard
Medidor de pH	HANNA HI 83141
Filtros 0,45 μm	CHROMAFIL Xtra PTFE – 45/25
Resina sintética	LANXESS Lewatit VPOC1064 MD PH®
Colorímetro	KONICA MINOLTA C-300

Tabela A3 - Classificação dos filossilicatos e características principais. Adaptado de [40]:

Tipo de estrutura	Carga por unidade	Grupo	Exemplos de minerais	Composição ideal
2:1	0	Pirofilite-Talco	Pirofilite*	$\text{Al}_4\text{Si}_8\text{O}_{20}(\text{OH})_4$
			Talco*	$\text{Mg}_6\text{Si}_8\text{O}_{20}(\text{OH})_4$
2:2	0,5-1,2	Esmectites	Montmorilonite**	$[(\text{Al}_{3,5-2,8}\text{Mg}_{0,5-1,2})(\text{Si}_8)\text{O}_{20}(\text{OH})_4]\text{Ex}_{0,5-1,2}$
			Saponite**	$[(\text{Mg}_6)(\text{Si}_{7,5-6,8}\text{Al}_{0,5-1,2})\text{O}_{20}(\text{OH})_4]\text{Ex}_{0,5-1,2}$

* Sem capacidade de expansão; ** Com capacidade de expansão

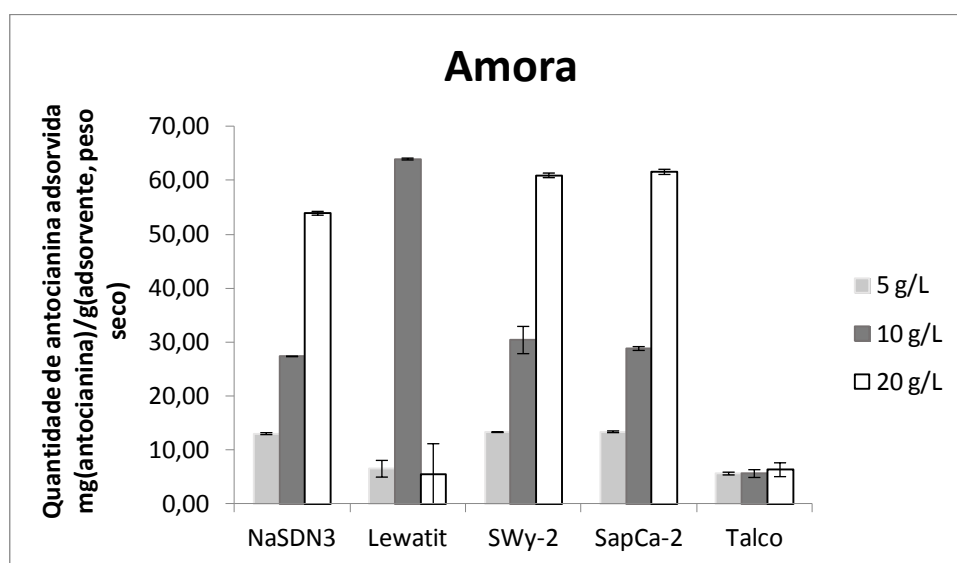


Fig. A1 - Quantidade de antocianina adsorvida em função da concentração da solução inicial de extrato de amora.

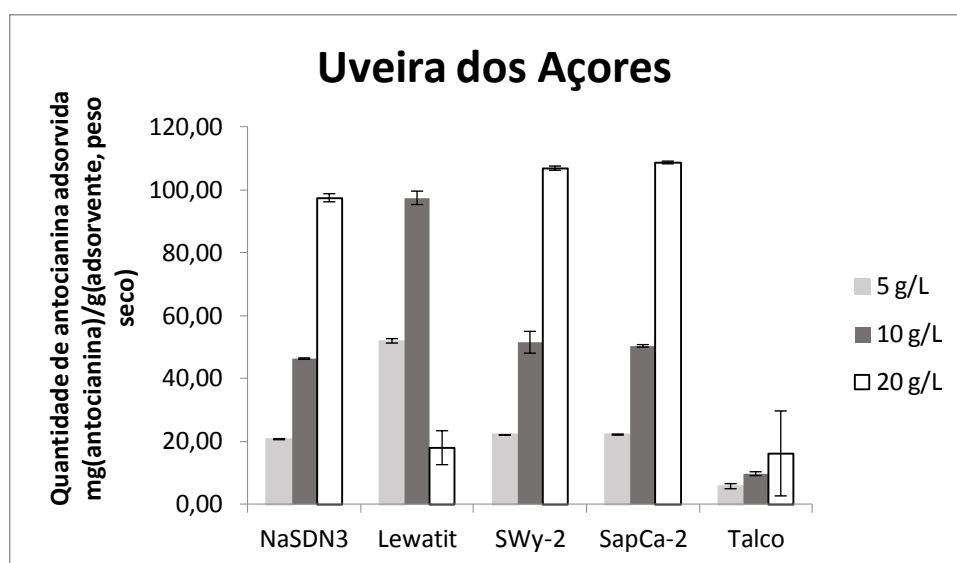


Fig. A2 - Quantidade de antocianina adsorvida em função da concentração da solução inicial de extrato de uveira dos Açores.

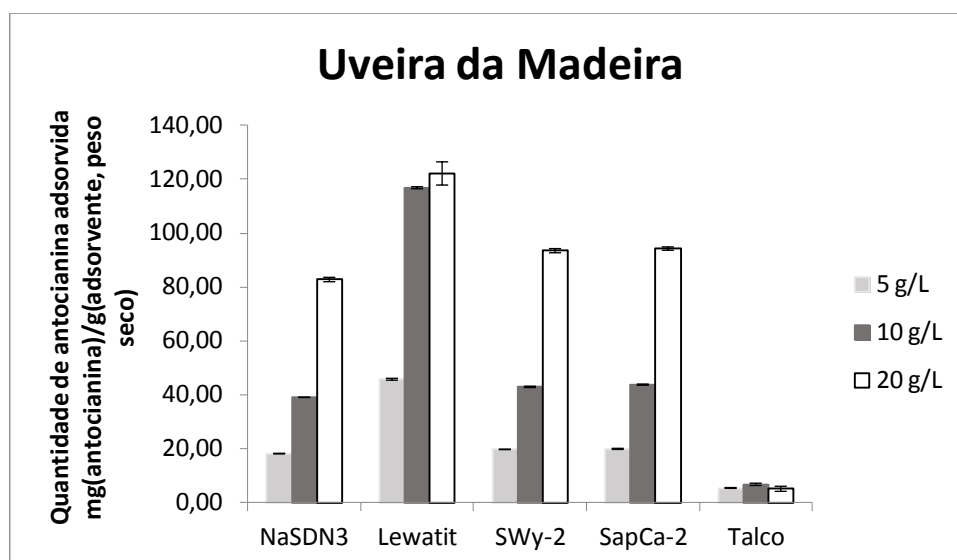


Fig. A3 - Quantidade de antocianina adsorvida em função da concentração da solução inicial de extrato de uveira da Madeira.

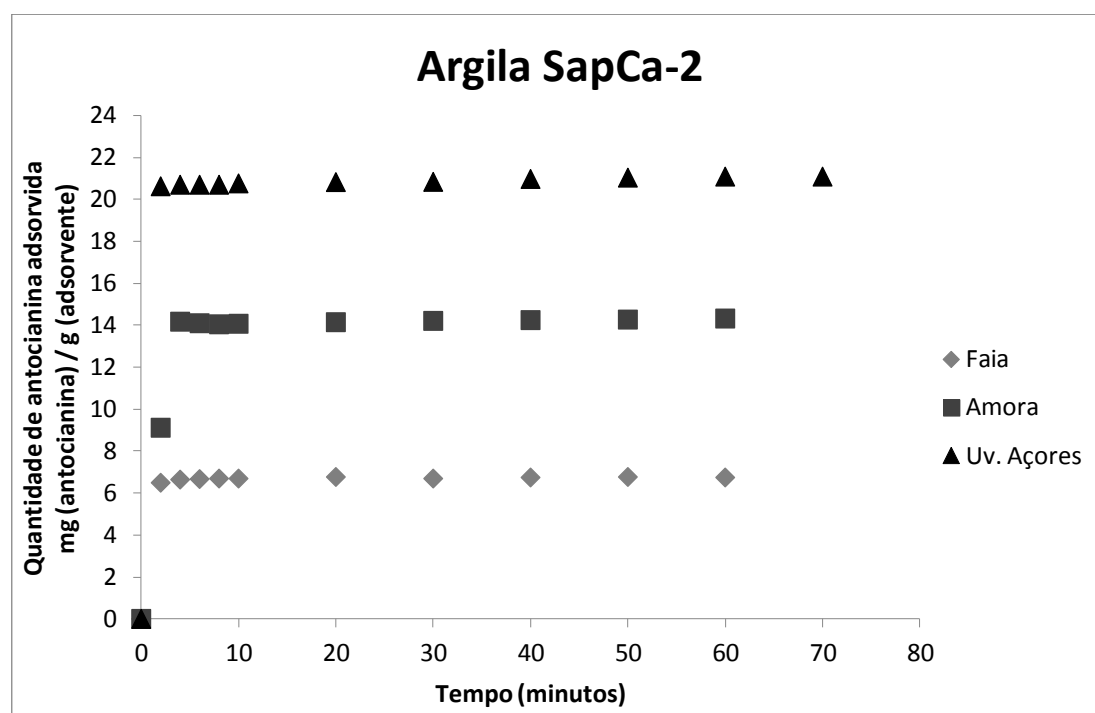


Fig. A4 - Curva de cinética de adsorção de extracto de antocianina de faia, amora e uveira dos Açores (5 g/L) na argila SapCa-2.

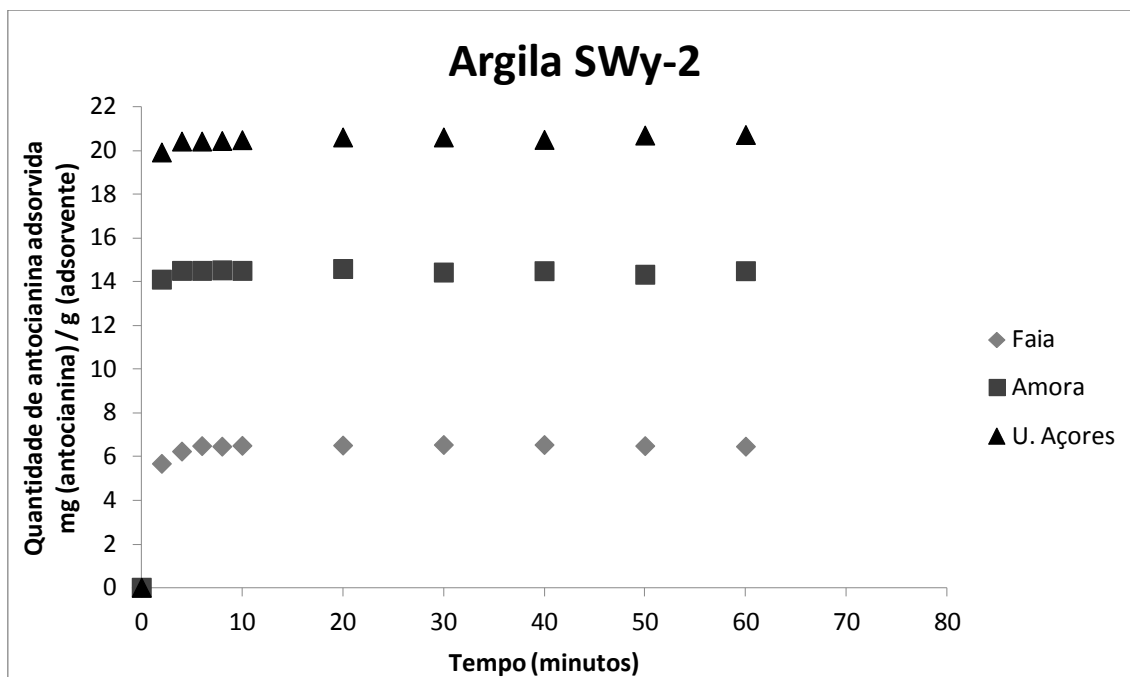


Fig. A5 - Curva de cinética de adsorção de extracto de antocianina de faia, amora e uveira dos Açores (5 g/L) na argila SWy-2.

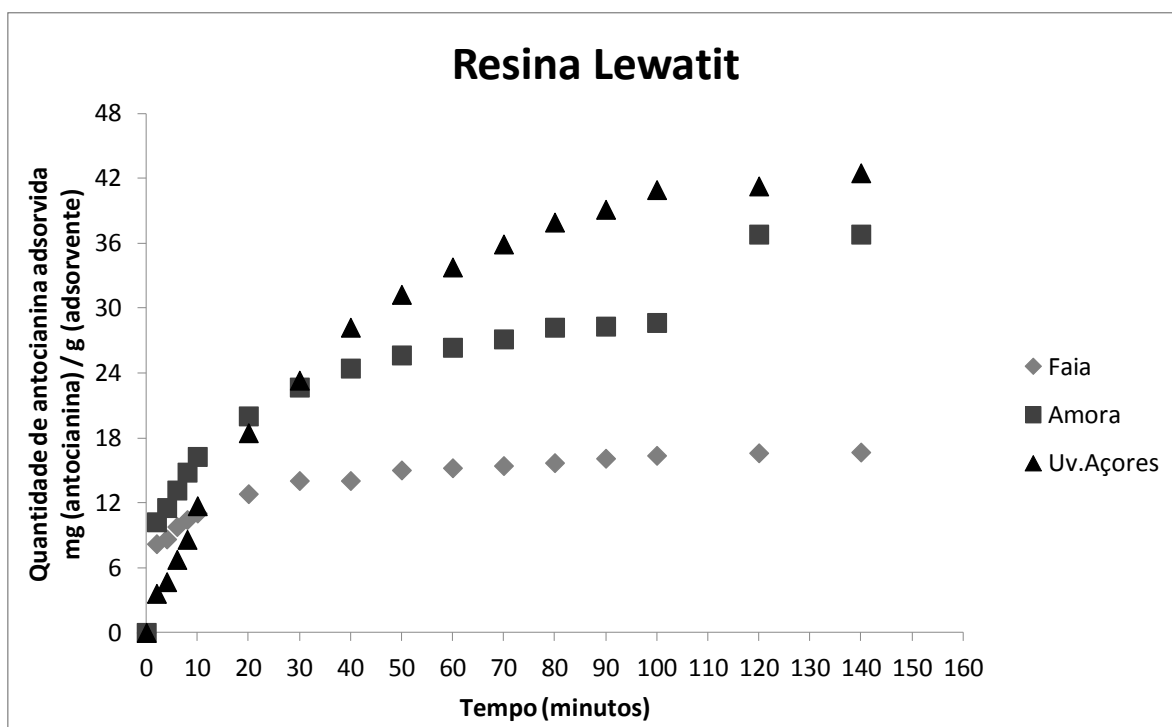


Fig. A6 - Curva de cinética de adsorção de extracto de antocianina de faia, amora e uveira dos Açores (5 g/L) na resina Lewatit.

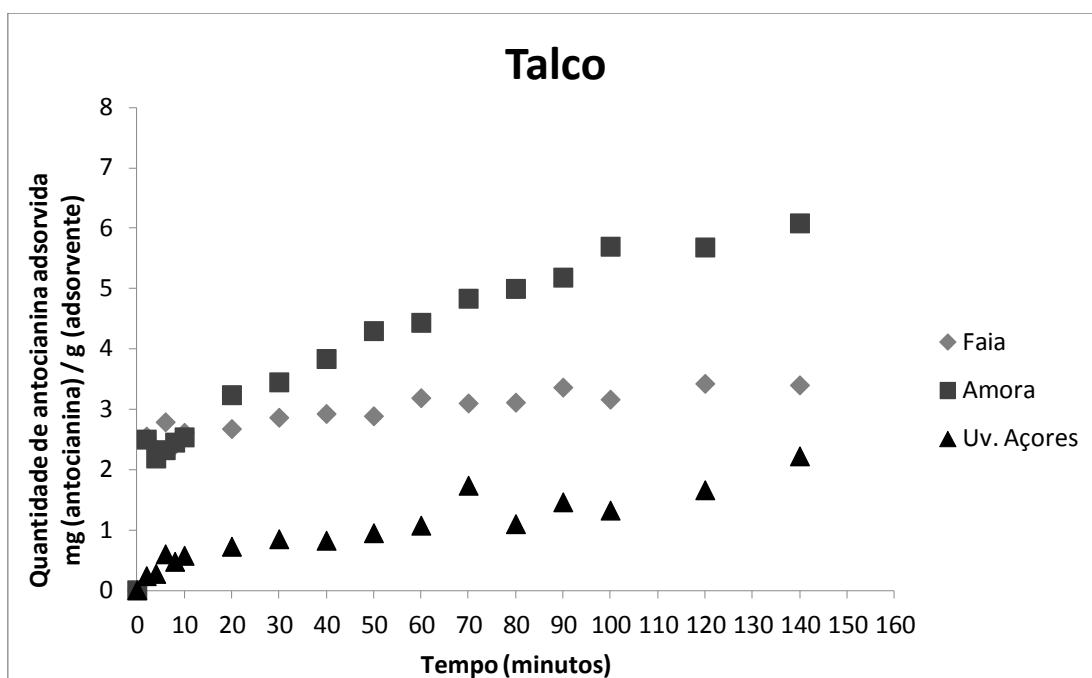


Fig. A7 - Curva de cinética de adsorção de extracto de antocianina de faia, amora e uveira dos Açores (5 g/L) no talco.

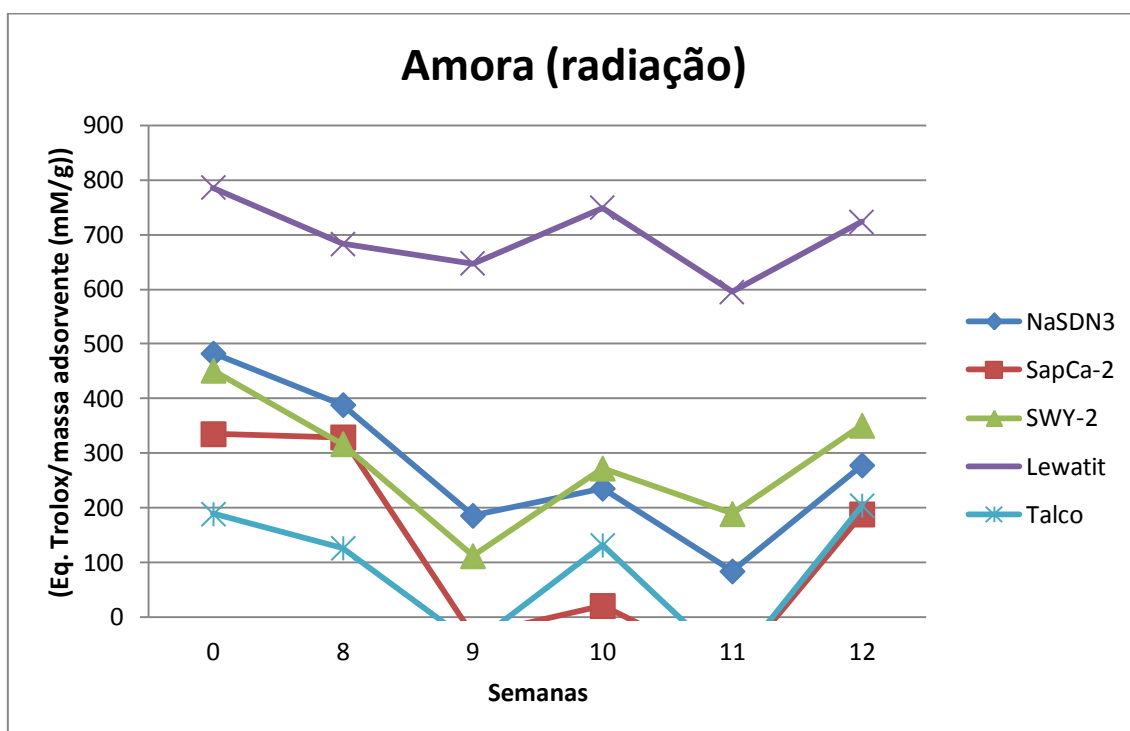


Fig. A8 - Variação da actividade antioxidante das matrizes adsorvidas com antocianinas de amora, ao longo das 4 semanas de exposição solar.

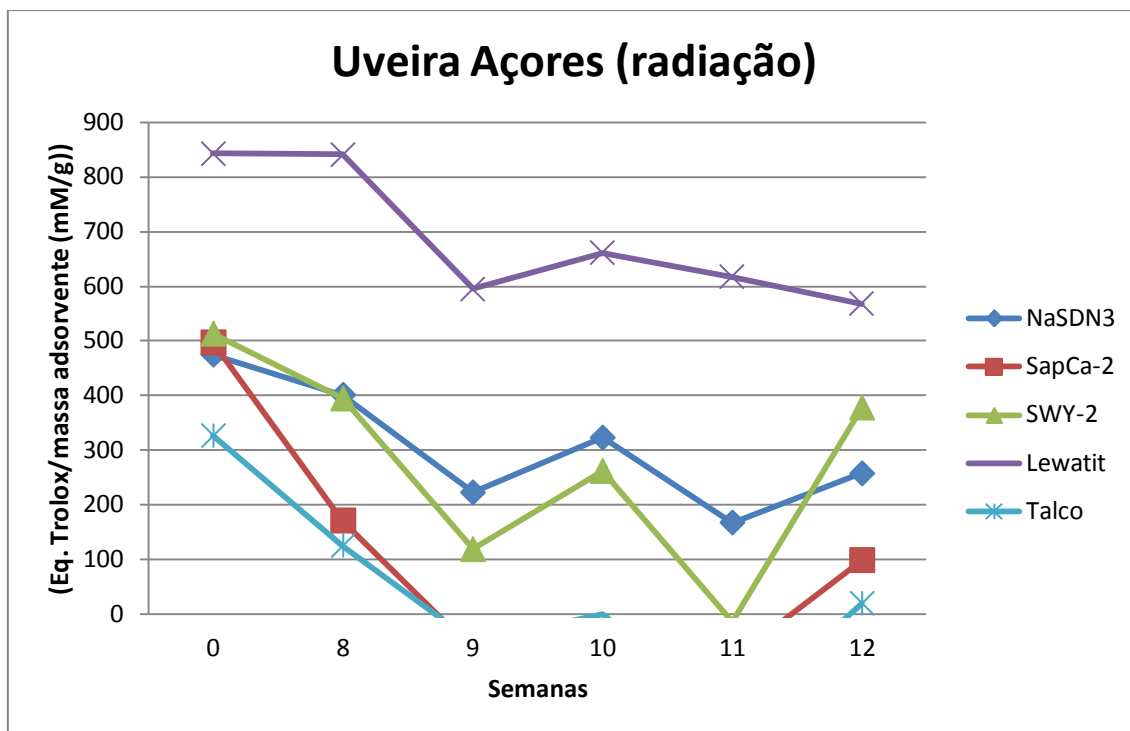


Fig. A9 - Variação da actividade antioxidante das matrizes adsorvidas com antocianinas da uveira dos Açores, ao longo das 4 semanas de exposição solar.

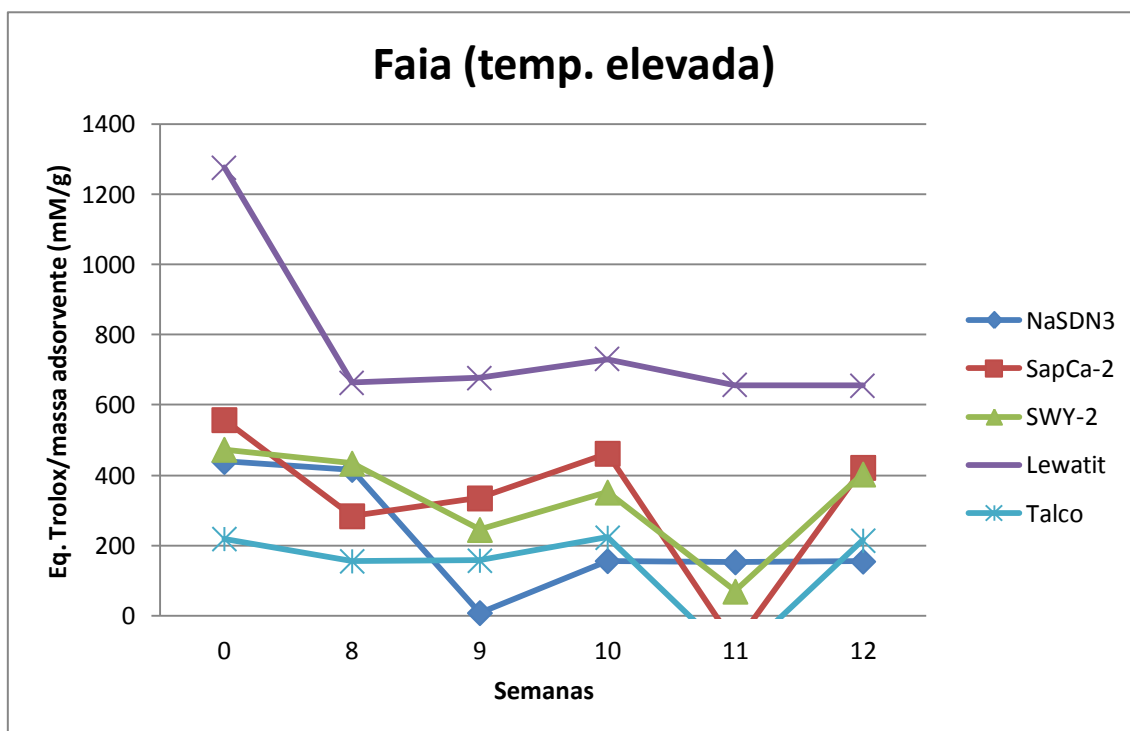


Fig. A10 - Variação da actividade antioxidante das matrizes adsorvidas com antocianinas da faia, ao longo das 4 semanas de exposição a temperaturas elevadas.

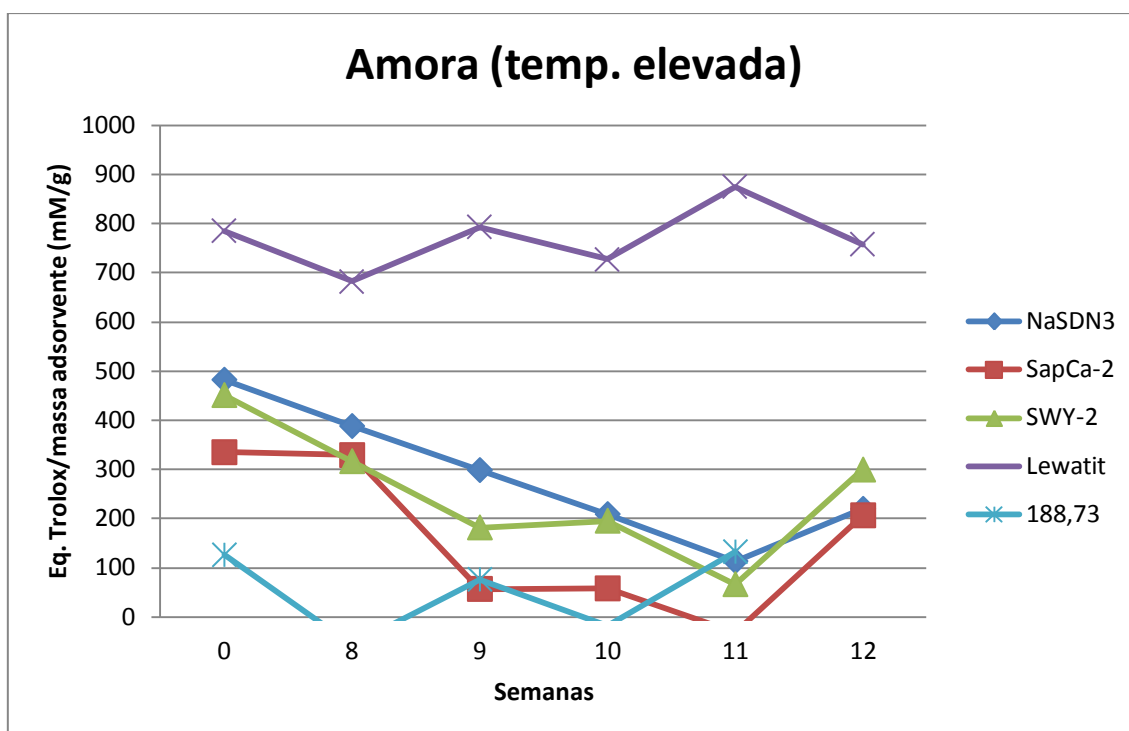


Fig. A11 - Variação da actividade antioxidante das matrizes adsorvidas com antocianinas da amora, ao longo das 4 semanas de exposição a temperaturas elevadas.

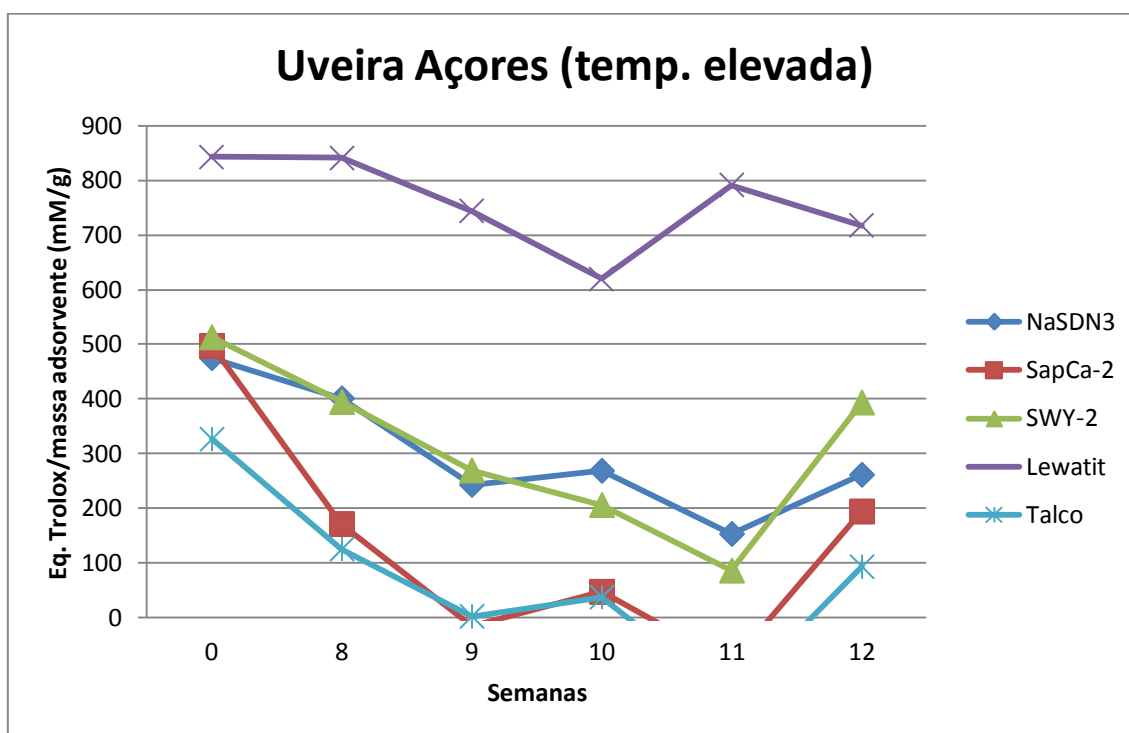


Fig. A12 - Variação da actividade antioxidante das matrizes adsorvidas com antocianinas da uveira dos Açores, ao longo das 4 semanas de exposição a temperaturas elevadas.

Tabela A4 - Parâmetros colorimétricos obtidos por CIELAB durante o estudo de variação de cor.

		Actividade antioxidante (eq. Trolox / massa de adsorvente (mM/g))									
		Semanas									
		0	8	9		10		11		12	
		Início	(após armazenamento a 4 °C)	Radiação	Temp.	Radiação	Temp.	Radiação	Temp.	Radiação	Temp.
Faia	NaSDN ₃	438,81	416,25	210,16	8,46	145,38	156,39	88,71	152,98	229,43	155,08
	SapCa-2	557,98	284,14	285,92	335,01	290,51	462,19	249,36	-81,55	368,74	422,04
	SWY-2	473,59	434,10	200,65	245,20	325,17	351,70	175,21	69,61	378,99	403,10
	Lewatit	1276,48	663,05	550,05	676,60	605,61	730,42	513,21	656,24	495,73	655,12
	Talco	219,46	155,85	65,53	157,52	231,99	223,12	-28,14	-127,26	92,96	214,58
Amora	NaSDN ₃	482,58	388,39	185,66	298,76	235,41	209,23	83,83	113,55	277,88	219,96
	SapCa-2	335,14	329,14	-33,94	57,06	20,61	58,15	-97,76	-31,70	188,19	206,77
	SWY-2	451,42	316,89	111,76	182,15	272,25	195,78	188,83	66,73	350,65	299,84
	Lewatit	785,84	683,12	647,22	793,70	748,99	728,27	595,03	875,01	723,27	758,51
	Talco	188,73	126,38	-48,84	-57,06	131,60	76,53	-92,05	-17,01	204,23	132,84
Uveira Açores	NaSDN ₃	474,73	401,16	222,60	242,88	322,92	268,54	167,40	152,98	257,34	261,23
	SapCa-2	497,15	171,11	-65,60	-15,63	-21,07	46,97	-82,81	-84,18	98,66	194,08
	SWY-2	513,06	394,51	118,71	269,31	261,89	205,97	-14,16	85,85	377,89	393,55
	Lewatit	843,13	841,32	595,03	743,74	660,97	620,07	617,33	791,35	567,77	717,50
	Talco	326,47	125,36	-52,09	2,17	-0,46	37,20	-193,08	-150,39	19,55	92,97

Tabela A5 - Parâmetros colorimétricos obtidos por CIELab durante o estudo de variação de cor.

			L*	a*	b*	ΔE*
ADSORVENTES FORNECIDOS (AF)		NaSDN ₃	64,91	1,84	14,47	-
		SapCa-2	90,14	-2,58	14,45	-
		SWy-2	80,69	-0,54	7,62	-
		Lewatit	89,49	-0,74	7,75	-
		Talco	95,45	-0,05	0,28	-
APÓS ADSORÇÃO (AC)	Faia	NaSDN ₃	57,8	14,47	7,65	16,02
		SapCa-2	56,21	28,79	12,16	46,27
		SWy-2	68,09	23,22	13,08	27,44
		Lewatit	-	-	-	-
		Talco	76,8	15,38	-1,61	24,28
	Amora	NaSDN ₃	55,54	12,46	6,33	16,34
		SapCa-2	59,47	24,2	12,72	40,75
		SWy-2	66,84	24,02	14,14	28,94
		Lewatit	70,12	3,58	6,97	19,86
		Talco	65,18	17,3	-4,89	35,27
	Uveira Açores	NaSDN ₃	40,71	16,9	2,04	31,10
		SapCa-2	49,43	21,4	5,57	48,07
		SWy-2	64,66	20,38	8,34	26,37
		Lewatit	61,18	-0,72	7,22	28,31
		Talco	68,18	14,5	-5,01	31,36
APÓS RADIÇÃO (ACI)	Faia	NaSDN ₃	47,44	15,38	6,31	10,49
		SapCa-2	54,36	28,1	11,57	2,06
		SWy-2	58,17	33,69	17,18	14,99
		Lewatit	70,2	5,27	9,43	-
		Talco	79,86	12,25	2,36	5,91
	Amora	NaSDN ₃	58,74	7,51	5,02	6,04
		SapCa-2	52,72	31,05	14,93	9,87
		SWy-2	65,5	27,5	15,74	4,06
		Lewatit	53,34	17,23	7,8	21,65
		Talco	66,19	17,6	-3,59	1,67
	Uveira Açores	NaSDN ₃	50,57	10,26	2,09	11,89
		SapCa-2	45,9	23,74	5,57	4,24
		SWy-2	50,63	35,92	10,2	21,02
		Lewatit	45,6	14,01	7,05	21,44
		Talco	72,44	13,81	-2,82	4,84

APÓS TEMPERATURA (ACT)	Faia	NaSDN ₃	45,82	12,81	5	12,38
		SapCa-2	49,72	25,06	9,53	7,93
		SWy-2	56,05	31,21	14,98	14,57
		Lewatit	68,22	4,22	5,34	-
		Talco	76,18	15,67	0,01	1,76
	Amora	NaSDN ₃	41,33	15,59	4,78	14,63
		SapCa-2	50,65	28,7	13,49	9,93
		SWy-2	55,59	31,11	16,98	13,60
		Lewatit	51,03	18,96	4,53	24,64
		Talco	64,26	18,76	-4,11	1,89
	Uveira Açores	NaSDN ₃	38,75	14,25	-0,7	4,29
		SapCa-2	46,72	24,76	6,17	4,36
		SWy-2	51,71	33,98	8,83	18,79
		Lewatit	47,34	6,54	3,2	16,14
		Talco	66,49	15,79	-6,99	2,91

Tabela A6 – Quadro resumo dos resultados obtidos ao longo do trabalho.

	Quantidade de antocianina adsorvida (mg (anto) /g (adsorvente seco))			Equilíbrio de adsorção (min ⁻¹)	Avaliação da estabilidade da cor (CIELab)					
					Radiação incidente			Temperatura elevada		
	Faia	Amora	Uv.Açores		Faia	Amora	Uv.Açores	Faia	Amora	Uv.Açores
NaSDN ₃	5,74 ± 1,06	13,33 ± 0,44	19,30 ± 1,93	20	+	-	-	-	?	-
SapCa-2	6,10 ± 0,89	13,84 ± 0,67	21,60 ± 0,72	20	+	?	?	-	?	?
SWy-2	5,95 ± 0,77	13,89 ± 0,83	21,37 ± 0,94	20	?	?	?	?	?	?
Lewatit	14,64 ± 2,84	33,46 ± 4,74	47,22 ± 6,68	60	-	-	-	-	-	-
Talco	2,94 ± 0,65	5,84 ± 0,33	11,45 ± 1,08	120	-	+	+	+	+	+

Legenda:

+ positivo

- negativo

? duvidoso

